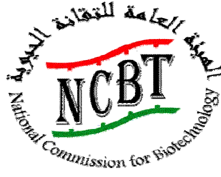
وزارة التعليم العالي
جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم علوم الأغذية



وزارة التعليم العالي
الهيئة العامة للتقانة الحيوية



إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من عزلات محلية من فطر

Penicillium spp.

Glucose oxidase production by local fungal isolates of *Penicillium* spp.

رسالة أُعِدَّت لنيل درجة الماجستير في علوم الأغذية

إعـــــــــداد

المهندسة سمر معلّا عيسى

إشـــــــــراف

د . أنور الحاج علي

أستاذ مساعد في قسم علوم الأغذية

كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق

د . صباح يازجي

أستاذ مساعد في قسم علوم الأغذية

كلية الهندسة الزراعية - جامعة دمشق

دمشق 2011 م



Ministry of Higher Education
National Commision for Biotechnology



Ministry of Higher Education
Damascus University
College of Agriculture
Department of Food Science

Glucose Oxidase production by local fungal isolates of *Penicillium* spp.

A THESIS

Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of
MASTER Of Food Science
Section

Prepared by

Samar Malla Issa
(National Commission for Biotechnology)

Supervision

Supervisor
Dr. Anwar Alhaj Ali

Prof. Of Food Science
Faculty of Agriculture
Damascus University

Co-Supervisor
Dr. Sabah Yazgi

Prof. Of Food Science
Faculty of Agriculture
Damascus University

Damascus 2011

قـدمت هـذه الرسـالة اسـتكمالاً لمتطلبـات نيـل درجـة الماجسـتير فـي قسـم علـوم الأغذيـة في كلية الزراعة، بجامعة دمشق.

This Thesis has been submitted as a partial fulfillment of the requirements for Master Degree in Food Science Department, Faculty of Agriculture, Damascus University.

لجنة الحكم:

الأستاذ الدكتور أنور الحاج علي (مشرفاً علمياً)

الأستاذ الدكتور صياح أبو غرة (عضواً)

الدكتور أيمن المريري (عضواً)

نوقشت وأجيزت في دمشق بتاريخ 6 /7/ 2011 م

شـهادة

نشـهد بـأنَّ العمـل الموصـوف فـي هـذه الرسـالة هـو نتيجـة بحـث علمـي قامـت بـه المرشـحة سمر معلا عيسى بإشراف الدكتور أنور الحاج علي الأستاذ المساعد في قسم علوم الأغذيـة فـي كلية الزراعة بجامعة دمشق, والدكتورة صباح يـازجي الأسـتاذ المسـاعد فـي قسـم علـوم الأغذيـة في كلية الزراعة بجامعة دمشق. وإنَّ أيـة مراجـع أخـرى ذكـرت فـي هـذا العمـل موثقـة فـي نـص هذه الرسالة.

المرشحة	المشرف المشارك	المشرف العلمي
سمر معلا عيسى	**د.صباح يازجي**	**د. أنور الحاج علي**

Testimony

We herby certify that this work is a result of a scientific research, conducted by the candidate Samar Malla Issa, under supervision of Dr. Anwar Alhaj Ali, Professor, Food Science department, Faculty of Agriculture, Damascus University, and Dr. Sabah Yazgi, Food Science department, Faculty of Agriculture, Damascus University. Any other references have been mentioned in this work are documented in the text of the thesis.

Candidate	Co-supervisor	Chairman
Samar Issa	**Dr. Sabah Yazgi**	**Dr. Anwar Alhaj Ali**

تـصـريـح

أصـرح بـأنّ هـذا البحـث بعنـوان: **" إنتـاج أنـزيم غلوكـوز أوكسـيداز مـن عزلات محليـة مـن فطـر *Penicillium spp.*** **"** لـم يسـبق أن قُبـل للحصـول علـى أيـة شـهادة ولـيس مقـدم حاليـاً للحصول على شهادة أخرى.

المرشحة

سمر معلا عيسى

DECLARATION

I hereby declare that research entitled: **" Glucose oxidase production by local fungal isolates of *Penicillium spp.* "** has not been accepted for any degree yet, nor submitted concurrently to any other degree.

Candidate

Samar Malla Issa

كلمة شكر

بعد الشكر والامتنان لله عز وجل على إتمام هذا البحث, تحتار الحروف ولا تدري كيف تسطر كلمات الشكر التي تفي بحق من ساعدني وتعبر عن مدى امتناني لوقوفهم إلى جانبي ...

بدايةً أتقدم ببالغ الشكر وخالص التقدير والاحترام إلى أستاذيّ الفاضلين (الدكتور أنور الحاج علي والدكتورة صباح يازجي) على ما بذلاه معي من جهد وماقدماه لي من نصائح وتوجيهات صائبة... منهما تعلمت كيف يكون التفاني والإخلاص في العمل, ومنهما عرفت قيمة النجاح ومعناه. كما أتوجه بالشكر إلى كلية الزراعة وقسم علوم الأغذية رئيساً وأساتذة وأخص بالشكر الدكتور جهاد سمعان مثال الأخلاق العالية والذي ساعدني في إتمام الدراسة الإحصائية بكل نبل وإنسانية وتواضع.

وبفيض من الحب والتقدير أتقدم بخالص الشكر والامتنان إلى عائلتي الثانية الهيئة العامة للتقانة الحيوية التي أنجزت بحثي في مخابرها, وأخص بالشكر الأستاذ الدكتور عصام قاسم المدير العام لهيئة التقانة الحيوية لما قدمه ويقدمه من دعم للبحث العلمي, واعترافاً بالجميل أتقدم ببالغ الشكر والإمتنان إلى الأستاذ الدكتور فواز العظمة الذي لم يتوانى في تقديم أي معلومة علمية بصدره الرحب وابتسامته المعهودة. وشكري الكبير لزملائي في الهيئة العامة للتقانة الحيوية وللدكتورة لينة الأمير على كل ماقدموه لي من معونة أو نصيحة عن طيب خاطر, وهنا لا أستطيع إلا أن أتذكر زميلي المهندس الغائب الحاضر مرفق سليمان رحمه الله وأقول له شكراً....

كما أتقدم بخالص الشكر والتقدير لأعضاء لجنة المناقشة والحكم الأستاذ الدكتور صياح أبو غرة والدكتور أيمن المريري لقبولهم تحكيم ومناقشة هذه الرسالة وعلى ماقدموه لي من ملاحظات قيمة أغنت بحثي.

وأخيراً خالص تقديري وامتناني لأهلي الذين وقفوا إلى جانبي طيلة فترة دراستي ودعموني دعماً لامحدود .

الإهداء

إلى قدوتي الأولى والنبراس الذي ينير دربي ..

إلى المربي الفاضل الذي نسج لي طريق النجاح في حياتي..

إلى الساعد الذي يشد على يدي والقوة التي تزيد من عزمي ..

إلى من يحرضني على إكمال مسيرتي مهما واجهت من صعوبات..

إلى من أضعه وساماً على صدري وتاجاً على رأسي..

إلى العظيم أبداً في قلبي وفي عيني..

إلى من أرفع رأسي عالياً افتخاراً به ..

والدي الحبيب أطال الله عمره

إلى من ملكت حواسي وإحساسي واحتوت عقلي وأفكاري وهامت بها نفسي وأنفاسي...

إلى الحب الصادق والشمس الوضاءة التي أنارت لي دروب النجاح في الحياة...

إلى قمري الذي لا يغيب وشمسي التي لا ينقطع دفؤها أبدا...

إلى الروح الزكية التي يتوب عندها كل شقاء...

إلى الصدر الذي يضمني كلما ضاقت بي الدنيا وأحاطت بي المخاطر..

إلى أغلى وأعز إنسانة على قلبي...

أمي الغالية أطال الله عمرها

إلى من أعيش معهم أحلى لحظات الحياة..

إلى من أرى نفسي بعيونهم وأمتلك الدنيا بوجودهم..

إلى من سكنوا قلبي نبضاً وتملكوا جسدي روحاً..

إلى سندي وقوتي وعتادي يوم الصعاب..

أخوي الحبيبان (حازم وعلاء)

إلى ملاذي الذي أفر إليه كلما ضاقت بي الدنيا..

إلى من وقفوا إلى جانبي وشجعوني في لحظات اليأس..

إلى من فرحوا لفرحي وحزنوا لحزني..

إلى توأم روحي وزهرة عمري وقرة عيني..

أختاي الحبيبتان (عبير وريم)

إلى أغلى هدية من الخالق..

فبوجودهما أشرقت الدنيا وأينعت الزهور.. وغردت الطيور.. وفرح القلب وانتشى بالسرور..

أبناء أخوتي (أحمد ومعلا)

إلى من شاء القدر أن يكملوا عائلتنا الصغيرة فحلوا في القلب قبل العين..

إلى من قاسمونا أفراحنا وأحزاننا..

إلى بهجة الحاضر وسعادة المستقبل ..

(رائد زوج أختي وريم زوجة أخي)

إلى من أقضي معهم أجمل اللحظات..

إلى من تجمعني بهم أحلى الذكريات..

أصدقائي وزملائي الغوالي

المحتويات

الفصل الثالث

الفصل الرابع

الفصل الخامس

الفصل السادس

الفصل السابع

قائمة ا لجداول

قائمة الأشكال

قائمة المختصرات

ABTS	2, 2’-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat
CAT	Catalase
DNA	Deoxy ribonucleic acid
DNS	3,5- Dinitro salicylic acid
FAD	Flavine Adenine Dinucleotide
FDA	Food and Drug Administration
GOX	Glucose oxidase
GRAS	Generally Regarded As Safe
H_2O_2	Hydrogen Peroxide
HRP	Horse Radish Peroxidase
LP	Lactoperoxidase
P.	*Penicillium*
PDA	Potato Dextrose Agar
RSM	Response Surface Methodology
SCN^-	Thiocyanate
μg	Microgram

الملخص

أخذت 20 عزلة من فطر *Penicillium* spp. من مصادر محلية متنوعة (هواء, تربة, عصائر, مربيات) وشخصت العزلات شكلياً ومجهرياً ومن ثم تمت غربلة هذه العزلات لمعرفة مدى مقدرتها على إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز باستخدام طريقة مرجعية وذلك بعد تنميتها على وسط يحتوي على O-anisidine لمدة أربعة أيام, ثم قيس مقدار إنتاج الأنزيم بالاعتماد على قطر الهالة اللونية التي تتشكل حول المستعمرات بعد إضافة أنزيم البيروكسيداز. أثبتت الدراسة أن العزلات Jm3 (*P. citrinum*), Jm4 (*Penicillium* spp.), Fr1 (*P. citrinum**) Be1 (*P. expansum*) و Ju1 (*P. paraherquei*) ذات قدرة على إنتاج الأنزيم مقارنة بباقي العزلات. وتميزت العزلة Jm3 بأعلى كفاءة إفرازية حيث وصل متوسط قطر الهالة حول المستعمرة إلى 6.3±0.12 مم وتبين من تشخيص هذه العزلة بأنها تنتمي إلى النوع *P. citrinum* ومن ثم تم أمثلة ظروف إنتاج الأنزيم باستخدام التصميم الإحصائي Response Surface Methodology (RSM) وتبين بأن درجة الحرارة المثلى 30° م, درجة الحموضة المثلى كانت pH=6, أفضل مدة تحضين كانت 3 أيام, أفضل سرعة تهوية كانت 250 دورة/دقيقة , ونسبة الكربوهيدرات (الغلوكوز) المثلى كانت 8%. وبينت النتائج أن هناك تأثير معنوي لكل من درجة الحرارة ومدة التحضين ونسبة الغلوكوز في فعالية الأنزيم, بينما لوحظ عدم تأثير درجة الحموضة (pH) وسرعة التهوية في فعالية الأنزيم معنوياً, وبالتالي لا تتغير فعالية الأنزيم بتغير هذين المتغيرين. بينما كانت علاقة درجة الحرارة معنوية مع كل من مدة التحضين ونسبة الغلوكوز.

Abstract

20 isolates of fungi (*Penicillium* spp.) were taken from various local sources (air, soil, juices, jams) and were classified morphological and microscopical criteria. These isolates were screened to determine the ability to produce glucose oxidase enzyme using a reference method. After they were cultured during four days on a synthetic medium containing O-anserine, the activity of glucose oxidase was estimated by measuring the diameter of colored diffusion zones around the colonies after adding peroxidase enzyme. The results showed that the local isolates Jm3 (*P. citrinum*), Jm4 (*Penicillium* spp.), Fr1 (*P .citrinum**), Be1 (*P. expansum*) and Ju1 (*P. paraherquei*) were very effectively when compared with the other isolates. Jm3 isolate showed the highest level with the average diameter of colored zone of 6.3±0.12 mm. This isolate was classified as *P. citrinum*. Then the culture conditions of glucose oxidase production were optimized using statistical design Response Surface Methodology (RSM). The optimum temperature was 30?C, the optimum pH was 6, optimum incubation time was 3 days, optimum aeration speed was 250 rpm and optimum glucose percentage was 8%. The results showed that there were significant effect of temperature, incubation time, and glucose percentage on enzyme activity, while there was no significant effect of pH or aeration speed on enzyme activity, therefore, the enzyme activity had no change with these variables. The effect of temperature with incubation time and glucose percentage was very significant.

المقدمـــــــــــة

INTRODUCTION

1- المقدمـــــة introduction

اكتشفت منذ بداية القرن التاسع عشر مواد معينة من شأنها أن تسرع التفاعلات الكيميائية عرفت فيما بعد باسم الأنزيمات, وكان Willy Kuhne أول من صاغ كلمة إنزيم (enzyme) في عام 1878 للإشارة إلى مواد تتواجد بالخلية الحية وتسهم في عملية التخمر. والكلمة مشتقة من أصل يوناني وتعني (En zyme) فالمقطع "en" يعني" في " أما "zyme " يعني الكائن الحي. الأنزيمات عوامل مساعدة بروتينية تعمل داخل الأنظمة الحيوية ولكن البعض منها له القابلية على العمل خارج الأنظمة الحية. تنتج بعض الأنزيمات على نطاق تجاري بكميات كبيرة سنوياً لتستعمل في العديد من الأغراض الطبية والصناعية وأغراض أخرى, وقد عرف تأثير الأنزيمات في مجال الأغذية منذ القديم في صناعة الخبز والمعجنات والحلويات وصناعة الألبان والأجبان وتطرية اللحوم وغيرها من الصناعات, ومع ذلك يعتبر مجال الأغذية من أضيق المجالات أمام استعمال الأنزيمات لأن هناك العديد من التحذيرات والتقييدات والقوانين الصارمة حول استعمالها بغرض حماية الصحة.

استخلصت الأنزيمات في الماضي من النباتات والحيوانات إلا أن إنتاجها بواسطة الكائنات الحية الدقيقة ازداد بسرعة كبيرة بسبب سرعة نموها وتكاثرها ورخص وتوفر المواد الأولية اللازمة لتنميتها, فضلاً عن إمكانية تحسين إنتاجها من خلال التحكم في الظروف المزرعية للوصول إلى الظروف البيئية والتغذوية المثلى للإنتاج, وإن ما استخلص من الأنزيمات الميكروبية يبلغ في الوقت الراهن أكثر من ألفي أنزيم, لكن المستخدم منها على نطاق تجاري لايتجاوز 20 أنزيم, وأغلبها أنزيمات تحلل مائي مثل الأميلاز والسيلولاز إضافة إلى أنزيمات أخرى تستعمل في التصنيع الغذائي. ورغم محدودية الأحياء الدقيقة المستخدمة في الإنتاج الصناعي للأنزيمات إلا أن التوجه يزداد يوماً بعد يوم لاستغلال التطورات الهائلة التي تشهدها حقول التقانة الحيوية لإنتاج أنزيمات بمواصفات وكميات تلبي احتياجات الأسواق العالمية من هذه الأنزيمات, ويعتبر أنزيم الأميلاز أول الأنزيمات المنتجة صناعياً من مصدر فطري عام 1894م واستخدم وقتها للأغراض العلاجية ثم تلاه إنتاج العديد من أنزيمات الهيدرولاز كالبروتياز والليباز التي استخدمت في عملية تصنيع المنظفات, ومؤخراً ازداد اهتمام الباحثين بإنتاج أنزيمات الأكسدة والإرجاع من الأحياء الدقيقة نظراً لأهميتها التطبيقية وخاصة في مجال التصنيع الغذائي فهي تؤدي عدة وظائف منها منع تفاعلات الإسمرار, ومنع تطور النكهات غيرالمرغوب بها في الأغذية, كما تلعب دور كاسحات للأوكسجين, ومن هذه الأنزيمات أنزيم الكاتالاز والليبوأوكسيداز والبيروكسيداز وغلوكوز أوكسيداز.

ونظراً لعدم وجود دراسات سابقة في القطر العربي السوري تتعلق بإنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من الأحياء الدقيقة ونظراً للأهمية التطبيقية لهذا الأنزيم في مجالي الأغذية والصيدلة فقد **هدف البحث** إلى :

1 - الحصول على عزلات فطرية نقية من فطر *Penicillium* من مصادر محلية مختلفة.

2 - غربلة العزلات اعتماداً على قدرتها على إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز واختيار أفضلها وتشخيصها.

3 - أمثلة ظروف إنتاج الإنزيم (درجة الحرارة - درجة الحموضة - مدة التحضين – سرعة التهوية وتأثير نسبة الغلوكوز) باستخدام التصميم الإحصائي (RSM) Response Surface Methodology.

الدراسة المرجعيـــة

Literature review

2- الدراسة المرجعيـــــة Literature review

تعتبر التربة والفضلات العضوية من أهم الأوساط الملائمة لنمو الفطور الهيفية, التي تنتشر في العديد من البيئات الطبيعية متغذية على المواد العضوية والمخلفات النباتية والحيوانية وتلعب خلال ذلك دوراً هاماً في إعادة تدوير الكربون والعناصر الغذائية الأخرى. ويعزى نجاح الفطور في النمو في بيئة ما إلى مدى قدرتها على إنتاج أنزيمات مختلفة يمكن استخدامها في إنتاج مركبات عضوية كمصادر مغذية (Gouka *et al*.,1997), وكنتيجة للأبحاث والدراسات التي أجراها الرواد الأوائل أمثال باستور وغيره, أصبح من الممكن أن تكون الكائنات الحية الدقيقة هي مصنع كيميائي يستطيع تحت ظروف معينة ومحددة إنتاج مئات المنتجات الغذائية والصناعية والطبية نتيجة للتغيرات الكيميائية التي تحدثها على بعض المواد الخام, ومع أن المفهوم الشائع للأحياء الدقيقة بما فيها الفطريات قد اقترن مع الأمراض, إلا أن لهذه الأحياء الدقيقة فوائد لا تحصى, ولا نبالغ إذا قلنا أن استمرار الحياة على وجه الأرض مستحيل بدون هذه الكائنات المجهرية, وقد استطاع الإنسان بإمكاناته العقلية أن يطور العلاقة بينه وبين هذه الأحياء, فقام بدراستها وتصنيفها لتحديد الضار منها والعمل على الحد من تأثيره, كما اكتشف منها ماهو نافع ودرس خصائصها المختلفة, وحصل منها على منتجات مفيدة من غذاء وشراب ودواء (الخياط, 2005).

تغيرت نظرة العالم إلى الفطريات منذ أن اكتشف المضاد الحيوي البنسلين وما تبعه من إنقاذ أرواح كثير من البشر خلال الحرب العالمية الثانية, أو على الأقل أنقذ أطرافهم من البتر, ومنذ ذلك الحين وضعت الفطريات في مكانها اللائق بها (أحمد والنواوي, 1999).

استفاد الإنسان من الفطريات منذ نشأته الأولى, حيث تعلم كيف يصنع خبزاً جيد التخمر, وجعة ونبيذ دون أن يدري شيئاً عن الفطريات والتخمرات, ومنذ ذلك الحين تستعمل الفطريات في صناعة أنواع لا حصر لها من الأطعمة والمشروبات, وقد احتلت الفطريات موقعاً هاماً في مجال الميكروبيولوجيا والكيمياء الحيوية وذلك لقدرتها على إنتاج العديد من المنتجات الهامة والفعالة كالأنزيمات وغيرها من المركبات الحيوية كالأحماض العضوية مثل Citric acid, Gallic acid, Gluconic acid, Fumaric acid, Malic acid و Ascorbic acid والعديد من الفيتامينات ومركبات النكهة التي يمكن استخدامها في صناعة الأغذية كمواد مضافة, ومن أهم الأنزيمات المنتجة من الفطريات السيللولاز, الليباز, البروتياز, الأميلاز, البكتيناز, الأستيراز وغلوكوز أوكسيداز وغيرها (David *et al*., 2008).

1-2- الأنزيمات:

تعرف الأنزيمات بأنها مواد عضوية ذات طبيعة بروتينية تصنعها الخلايا الحية لتقوم بدور الوسيط في التفاعلات الحيوية ضمن الظروف المثالية لعملها من حموضة pH وحرارة وتركيز مادة التفاعل وغيرها (فودة وزملائه, 1998). ولا يطرأ على الأنزيمات أي تغيير أثناء التفاعل الكيميائي فهي تعمل على خفض طاقة التنشيط الضرورية في بداية التفاعل دون أن تؤثر في ثابت اتزان التفاعل أو في تغيرات الطاقة الحرة له (الخياط ومحمد, 2000), وهي تلعب دور محفزات عضوية معقدة ذات منشأ بيولوجي, تتكون من بروتينات بسيطة أو مقترنة تحتوي على بعض المجاميع الكيماوية الأخر, ويسمى المعقد الأنزيمي بالأنزيم الكلي Holoenzyme عندما يتكون من جزء بروتيني Apoenzyme وجزئية عضوية قليلة الوزن الجزيئي هي المساعد الأنزيمي Coenzyme ولاشك أن المجموعات غير البروتينة هى جزء من المركز الفعال للأنزيم, وقد دلت الابحاث على أنه يمكن فصل المجموعة غير البروتينية عن الشق البروتينى فى بعض الأنزيمات فى حين لا يمكن حدوث ذلك فى البعض الآخر نظراً لارتباط الشقين (فودة وزملائه, 1998).

قسمت الأنزيمات إلى ستة مجموعات بناءً على توصيات الإتحاد الدولي للكيمياء الحيوية (الخفاجي, 1990) وهي كالتالي:

أنزيمات الأكسدة والإرجاع	Oxidoreductase
الأنزيمات الناقلة	Transferase
أنزيمات الحلمأة	Hydrolase
أنزيمات التفكيك	Lysase
أنزيمات التماكب	Isomerase
أنزيمات الربط	Ligase

احتلت الأنزيمات دوراً هاماً في كافة مجالات الحياة في الوقت الحاضر فهي تستخدم اليوم في صناعة الأدوية والمنظفات ومستحضرات التجميل وترويق العصائر مثل الأميلاز بأنواعه, السيللولاز, أنفرتاز, لاكتاز, بروتياز الخ (Novo Nordisk, 2004). ثم تطورت تقنيات الإنتاج الأنزيمي بعد الحرب العالمية الثانية من خلال تطور تقنيات التخمير ودراسة الظروف المثلى للإنتاج (Biziulevichus and Lukauskas, 1998).

تركز الإهتمام على إنتاج هذه الأنزيمات من الأحياء الدقيقة خاصة تلك المفرزة خارج الخلايا في الوسط الزرعي (Extracellular enzyme) ودون الحاجة إلى تحطيم هذه الخلايا للحصول على الأنزيمات لاسيما وأنها أكثر استقراراً من الأنزيمات الداخلية (Intracellular enzyme) (Schallmey *et al*., 2004).

2- 2- أنزيم غلوكوز أوكسيداز:

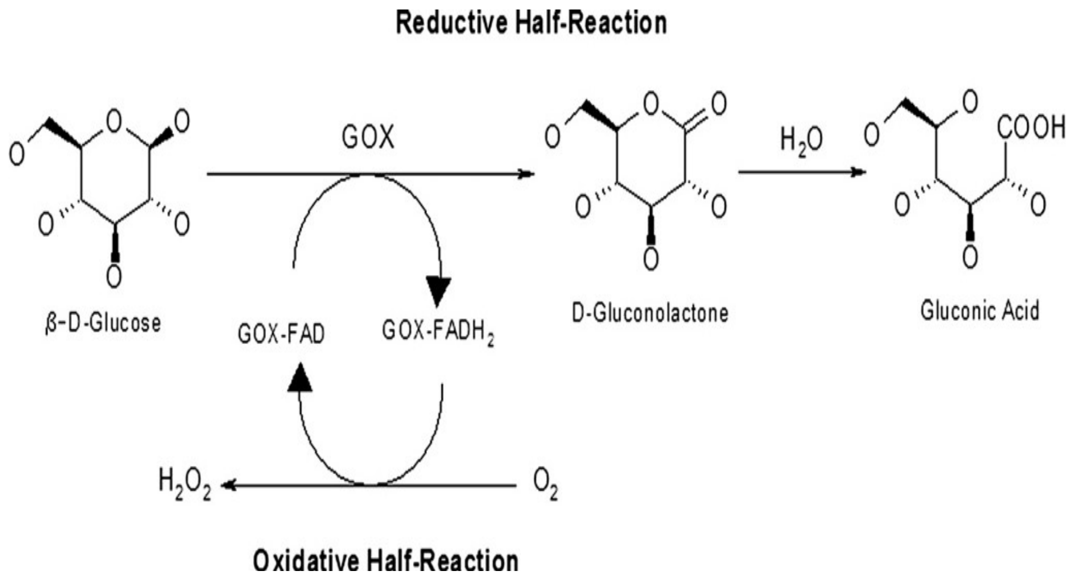
يعتبر أنزيم (B-D-glucose:O_2-1-oxidoreductase EC 1.1.3.4) من أهم الأنزيمات المنتجة من الفطور (Witteveen et *al*., 1992) حيث ينتمي إلى مجموعة أنزيمات الأكسدة والأرجاع Oxidoreductase ويسمى أيضاً aerodehydrogenase آيروديهايدروجيناز (Witteveen *et al*., 1990) وهو عموماً غلوكوبروتين, وزنه الجزيئي حوالي155 كيلودالتون ويتألف من سلسلتي بولي ببتيد متماثلتين كل منهما 80 كيلو دالتون, ترتبط الوحدات مع بعضها بواسطة روابط كبريتيدية (disulfide), ويحتاج الأنزيم إلى عامل مساعد (كوأنزيم) FAD (فلافين أدنين داي نيوكليوتيد) للقيام بعمله (Witt *et al*., 2000).

تعتبر المستحضرات الجافة لهذا الأنزيم ثابتة ومستقرة ويمكن تخزينها لفترة طويلة في البراد (Rando *et al*., 1997) ومحاليله ثابتة ومستقرة أيضاً تحت شروط واسعة, كما أنه عالي التخصص النوعي تجاه B-D-Glucose ويثبط نشاطه بوجود شوارد (Ag^{+}, Hg^{+2}, Cu^{+2}) (Nakarmura and Ogura, 1968), ويمكن زيادة إنتاج الأنزيم بإضافة المنغنيز والكوبالت وحمض الغلوكونيك إلى وسط إنتاجه (Liu *et al*., 2001), ويعزز الكالسيوم من إنتاج الأنزيم عندما يضاف على شكل كربونات $CaCo_3$ بينما يثبط إنتاج الأنزيم عند إضافته بصورة كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ (Khurshid *et al*., 2011).

تحتوي المستحضرات المستخلصة في كثير من الأحيان على أنزيم الكاتالاز الذي يؤدي إلى التداخل مع الأغراض التي يستعمل فيها غلوكوز أوكسيداز, وعلى العموم يمكن أن ينقى الأنزيم من الشوائب حيث يرسب بواسطة الأملاح المتعادلة والمذيبات لتحضير الأنزيم الصلب ولكن الشكل الذائب هو المفضل. إن الأنزيم الناتج يكون حاوياً على نسبة من الكربوهيدرات تصل إلى 10% والتي يعتقد أنها تقوم بعملية توفير الحماية للأنزيم وزيادة ثباتيته دون التأثير في تركيب الأنزيم (الخفاجي, 1990).

3-2 - عمل أنزيم غلوكوز أوكسيداز:

يتوسط هذا الأنزيم الفطري عملية أكسدة B-D-Glucose ($C_6H_{12}O_6$) إلى غلوكونولاكتون ($C_6H_{10}O_6$) و H_2O, ثـم يتفكـك غلوكونولاكتـون تلقائيـاً أو أنزيميـاً إلـى حمـض غلوكونيـك ($C_6H_{12}O_7$) (Leskovac *et al*., 2005; Betancol *et al*., 2006) وهذا التفاعل يتم على مرحلتي أكسدة وإرجاع, ففي مرحلة الإرجاع يتوسط GOX عملية أكسدة B-D-Glucose إلـىD-gluconolacton, ويرجـع فلافـين أدنـين داي نيوكليوتيـد (FAD) إلـى ($FADH_2$) (Witt *et al*., 2000). أما في مرحلة الأكسدة يعاد أكسدة GOX المرجع باستخدام جزيء أوكسـجين ليعطـي بيروكسـيد الهيـدروجين (H_2O_2) الـذي يتفكـك بواسـطة الكاتـالاز (EC 1.11.1.6) (CAT) إلى ماء وأوكسجين (Beltrame *et al*., 2004) كما هو موضح في الشكل (1).



الشكل (1) يبين أكسدة الغلوكوز باستخدام غلوكوز أوكسيداز (Witt *et al* ., 2000)

2- 4 - استخدامات أنزيم غلوكوز أوكسيداز:

يملك أنزيم غلوكوز أوكسيداز تطبيقات تكنولوجية واسعة في مجالات عديدة سواء بالشكل الخام أوالنقي والتي عرفت منذ عام 1950 (Kona *et al*., 2001).

2- 4 - 1- في مجال الأغذيــــــة:

2-4-1-1- مادة مضافة للأغذية:

يعتبر غلوكوز أوكسيداز مادة آمنة GRAS حسب منظمة FDA ويمكن إضافته إلى الأغذية بصورة سائلة أو صلبة (بودرة), حيث يلعب دور مادة مضادة للأكسدة ومادة حافظة للأغذية. غالباً مايضاف غلوكوز أوكسيداز كمزيج مع الكاتالاز لأن الأنزيمين يوجدان معاً وبشكل طبيعي في الفطر (Witteveen *et al*., 1992), وعملية فصل غلوكوز أوكسيداز عن الكاتالاز عملية مكلفة جداً وغير ضرورية عند استخدامه كمادة مضافة للأغذية, علاوة على ذلك فإن الكاتالاز يساعد على تحطيم بيروكسيد الهيدروجين المنتج بواسطة غلوكوز أوكسيداز (Bao *et al*., 2001, 2003 a, b).

2-4-1-2- نظام LP- GOX:

يعد نظام LP جزءاً هاماً من نظام المناعة الطبيعي ضد الأحياء الدقيقة الممرضة, حيث يوجد في حليب الأم والدموع واللعاب. ويتألف هذا النظام من ثلاث مركبات هي: لاكتوبيروكسيداز, ثيوسيانات SCN^- , وبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2, ولكي يقوم LP بدوره الفعال يحتاج إلى SCN^- و H_2O_2, وإن وجود GOX وركيزته الغلوكوز يسمح بإنتاج H_2O_2 الضروري لنشاط LP (Seifu *et al*., 2005).

يستخدم نظام LP-GOX من أجل نقل وتخزين الحليب الخام ويفضل استخدامه عندما تكون عملية التبريد غير ممكنة أو كمكمل للتبريد في حال توفره. إن فترة صلاحية الحليب بوجود LP فعال تعادل ضعف فترة صلاحيته بوجود LP غير فعال (Marks *et al*., 2001). كما يستخدم نظام LP-GOX في منتجات الألبان لتثبيط مفعول البكتريا الممرضة, وفي عملية حفظ الأجبان (Sandholm *et al*., 1988).

لا يقتصر استخدام LP-GOX على حفظ الأغذية وإنما يستخدم أيضاً في معاجين الأسنان (Biotene, 2006; National Library of Medicine, 2007a) وفي منظفات الغسيل (National Library of Medicine, 2007b) وفي صناعة الشامبو ومستحضرات التجميل (Food Standars Australia New Zealand, 2002), كمايستخدم في صناعة اللحوم والأسماك (Seifu *et al*., 2005).

2-4-1-3- صناعة الخبز:

تعتبر عوامل الأكسدة والإنضاج مضافات أساسية للطحين, حيث تستخدم لتقوية الغلوتين وبالتالي تحسين الشكل النهائي للخبز, وهذا يتم من خلال أكسدة نوعين من البروتين داخل الطحين هما الغليادين والغلوتينين لتقوية الروابط وتكوين الغلوتين فيما بعد (Corriher, 2001). تحتاج صناعة الخبز إلى كمية قليلة من عوامل الإنضاج بمعدل أجزاء من المليون, وقد استخدمت برومات البوتاسيوم $KBro_3$ كعامل إنضاج للخبز (Figoni, 2003), ولكن تم التأكد فيما بعد بأن مادة البرومات مادة مسرطنة نتيجة تخريبها للـــ DNA (Moore and Chen, 2006), ونتيجة لذلك فإن معظم الدول منعت استخدام البرومات في الغذاء واستخدم GOX كبديل عنه في المخابز في مختف أنحاء العالم (Enzyme Technical Associaation, 2001), إضافة إلى ذلك فإن GOX يسبب تأثير مجفف للعجين (Vemulapalli and Hoseney, 1998) علماً أن البرومات لاتعطي هذا التأثير المجفف.

2-4-1-4- صناعة البيض المجفف :

يعرف تفاعل ميلارد بأنه تفاعل لا أنزيمي يحدث بين مجموعة الأمين في البروتين والسكر المرجع. هذا التفاعل يسبب تلون بني غير مرغوب ونكهة غير مستحبة في البيض عند تعرضه لحرارة التجفيف, لذلك يجب إزالة الغلوكوز من البيض قبل إجراء عملية التجفيف الرذاذي (Sisak *et al.*, 2006; Anastassiadis *et al.*, 2003).

تقدم هذه العملية فائدة إضافية وهي إطالة فترة صلاحية البيض المجفف وتعزيز مقاومة الكائنات الحية الدقيقة, علاوة على ذلك فإن إنتاج بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 يمكن أن يقتل الكائنات الحية الدقيقة الموجودة داخل البيض (Dobbenie *et al.*, 1995). إن عملية إزالة الغلوكوز من البيض عن طريق إضافة GOX قبل التجفيف الرذاذي هي طريقة مصرح بها من قبل FDA, كما وإن إزالة الغلوكوز باستخدام GOX غير مقتصرة على منتجات البيض فحسب وإنما يمكن استخدامها أيضاً في منتجات البطاطا لمنع حدوث تفاعل ميلارد (Low *et al.*, 1989).

2- 4 - 1-5- مضاد أكسدة :

يشكل وجود الأوكسجين مشكلة كبيرة في العديد من المنتجات الغذائية, ففي الأغذية عالية المحتوى من الدهون كالمايونيز تسبب عملية أكسدة الدهون طعماً متزنخاً ورائحة غير مستحبة (Isaksen and Adler-Nissen , 1997) وهذا مشابه لما يحدث في العديد من المشروبات كالبيرة و النبيذ وفي هذه الحالة يعد التخلص من الأوكسجين طريقة هامة للمحافظة على نكهة وطعم المشروب (Crueger and Crueger, 1990; Labuza and Breene, 1989).

ويزيد الأوكسجين من نمو البكتريا في الأغذية المعلبة لذلك من الضروري إزالة الأوكسجين من الفراغ الرأسي للعلب للمحافظة على الظروف اللاهوائية (Kirk *et al*., 2002).

يلعب غلوكوز أوكسيداز دوراً مهماً كمادة حافظة لزيادة مدة صلاحية الأغذية البحرية, حيث تغمس شرائح السمك أو السمكة بأكملها بمحلول (غلوكوز/GOX) قبل التبريد لزيادة فترة صلاحيتها (Field *et al*., 1986) وبنفس الطريقة يمكن معاملة الروبيان بهدف إطالة فترة حفظه (Dondero *et al*., 1993). وهذه الظاهرة تعود إلى تثبيط نمو الأحياء الدقيقة المفسدة مثل *Pseudomonas.fragi* الشائع وجودها في السمك (Yoo and Rand,1995), و *Pseudomonas.fluorescens* الموجود عادة في الروبيان (kantt *et al*., 1993), إضافة إلى *Salmonella* و *E.coli* (Massa *et al*., 2001).

2-4-1-6- تقليل نسبة الكحول في النبيذ :

يعد السكر مكوناً أساسياً في إنتاج الكحول بالتخمير فهو الركيزة التي تستخدمها خميرة *Saccharomyces cervisiae* لإنتاج الكحول, وإن خفض نسبة الغلوكوز تنتج كمية أقل من الكحول وهذا هو المطلوب لإنتاج نبيذ منخفض المحتوى من الكحول, وقد استخدمت طرائق عديدة لتحقيق ذلك (Gary, 2000), وتعتبر عملية إضافة GOX قبل عملية التخمير من أسهل هذه الطرائق. يستهلك GOX بعض الغلوكوز الموجود لجعله غير ميسر للتخمر الكحولي وبذلك ينتج نبيذ بمحتوى منخفض من الكحول (Pickering *et al*., 1998,1999 ab), وبنفس الوقت يقلل بيروكسيد الهيدروجين الناتج من فعالية الخميرة المستخدمة في التخمر الكحولي, ويعمل كمضاد ميكروبي وبالتالي يلعب دور مادة حافظة للنبيذ (Malherbe *et al*., 2003).

2-4-1-7- إنتاج حمض الغلوكونيك :

يعد حمض الغلوكونيك وأملاحه مواداً آمنة GRAS ويمكن أن يستخدم في مجال واسع من الصناعات (Ramachandran *et al*., 2006) منها صناعة النسيج, صناعة الإسمنت, تنظيف السطوح المعدنية, مواد مضافة للأغذية, مواد مطهرة, كما يدخل حمض الغلوكونيك وأملاحه في صناعة مستحضرات التجميل (Yuand Scott, 1997) وفي صناعة المستحضرات الصيدلانية (BACAS, 2004). ويستخدم حمض الغلوكونيك كمادة مضافة للأغذية لكونه عامل تحميض (CodexAlimentarius Commission, 2007a), عامل رافع للعجين, عامل مثبت للون, وعامل مضاد للأكسدة, كما يدخل في صناعة المشروبات والخبز والأغذية (Brookes*etal*., 2005).

2-4-1-8- مضاد ميكروبي :

يؤدي نشاط أنزيم غلوكوز أوكسيداز إلى إنتاج H_2O_2 الذي يلعب دوراً هاماً في تثبيط العديد من الجراثيم الممرضة في الأغذية (Kapata *et al*., 1998) مثل:

Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Salmonella infantis, Clostridium perfringens, Listeria monocytogenes و *Campylobacter jejune*.

2-4-1-9- وظائف أخرى للأنزيم:

- يستخدم في تقدير كمية الغلوكوز المتبقي في السائل الناتج عن عمليات التخمير (Sierra *et al*., 1997; Petrucoill *et al*., 1999) .
- يضاف الأنزيم مع الغلوكوز إلى الوجه الداخلي لورق التغليف في عملية تغليف الأغذية المجففة والأجبان ليعمل على أكسدة الغلوكوز مستهلكاً الأوكسجين ومنتجاً H_2O_2 لذي يحفظ الغذاء لفترة أطول (Hanft and Koehler., 2006).

ويوجد هذا الأنزيم في العسل و يلعب دور مادة حافظة طبيعية عن طريق إرجاع الأوكسجين إلى H_2O_2 الذي يعمل كمضاد ميكروبي.

2-4-2- في مجال الصيدلـــــــة :

يستخدم في تقدير مستوى السكر في الدم وبالتالي الكشف عن مرض السكري (Gerristsen *et al*., 2001). ويدخل في تكوين رقائق اختبار ورقية تكشف عن وجود الغلوكوز في البول عن طريق التغير اللوني الذي يحصل في الرقاقة عند غمسها في العينة (Wang, 2008; Cui *et al*., 2001). وقد استخدم في المخابر بهدف الكشف النوعي عن الغلوكوز بوجود السكاكر الأخرى. ومن التطبيقات الحديثة للأنزيم استخدامه في المجسات الحيوية (Biosensors) لتقدير الغلوكوز في التخمرات الصناعية (Malhotra *et al*., 2005; Sunga and Baeb, 2006) وفي تصنيع معاجين الأسنان (Petruccioli *et al*., 1999).

2- 5- الأحياء الدقيقة المنتجة لأنزيم غلوكوز أوكسيداز:

عزل أنزيم غلوكوز أوكسيداز من *Aspergillus niger* & *Penicillium glaucum* لأول مرة من قبل (Muller 1928), ويعد *Aspergillus* و *Penicillium* من أهم الأحياء الدقيقة لإنتاج هذا الأنزيم صناعياً (Bhatti and Saleem, 2009). و بناءً على الدراسة المرجعية للفطريات التي تقوم بإنتاج الأنزيم قيد الدراسة تم التوصل إلى الجدول (1) الذي يبين أهم الأنواع المنتجة للأنزيم.

الجدول (1) يبين أهم الأنواع الفطرية المنتجة لأنزيم غلوكوز أوكسيداز

اسم الفطر	المرجع
Talaromyces flavus	Kim *et al*., 1990
P. expansum	Petruccioli *et al*., 1993
P. italicum و *Penicillium* spp.	Petruccioli *et al*., 1993
P. paxilli	Fiedurek and Gromada , 1997
P. pinophilum	Rando *et al*., 1997
P. amagasakiense	Wohlfahrt *et al*., 1999
Botrytis cinerea	Hamid *et al*., 2003
P. notatum	Hamid *et al*., 2003
P.funiculosum	Sukhacheva *et al*., 2004
P. variabile	Pulci *et al*., 2004; Petruccioli *et al*., 1999
P. adametzii	Eremin *et al*., 2006
P. canescens	Simpson, 2006
Aspergillus niger	Lium *et al*., 1998; Yoon *et al*., 2010
P. chrysogenum	Ragini *et al*., 2010

2 - 6- عزل الفطـــــــــــر Isolation of fungi

تعتمد الخطوة الأولى في دراسة أي كائن مجهري على عزل هذا الكائن عن أشكال الحياة الأخرى, بحيث يصبح في بيئته الجديدة منفرداً عن غيره ونقياً, وتسمى هذه العملية بعملية العزل في مزارع نقية (isolation in pure culture) وتفيد هذه الخطوة لاحقاً في تجنب أخطاء التشخيص (Maheshwari *et al*., 2000), وتسمى هذه المزرعة النقية بالعزلة (isolate) إلى حين تشخيصها على مستوى الجنس والنوع من خلال دراسة خواصها المزرعية والمظهرية , وإذا ما أبدت عزلتان نقيتان تنتميان إلى نفس الجنس والنوع تبايناً في صفة معينة وكانت هذه الصفة أكثـر وضـوحاً فـي إحـداهما مقارنـة مـع الأخـرى توجـب تسـميتهما بسـلالتين مختلفتـين (Watana, 2002), وتتطلب عملية عزل الفطريات معرفة مسبقة للصفة المرغوبة في الكائن والتي تعتبر الهدف الذي من أجله عزل ذلك الكائن, حيث يتخذ من هذه الصفة عامل إنتخاب عنـد عـزل الفطريـات عـن بيئاتهـا الطبيعيـة كالتربـة والمـاء والهـواء وغيرهـا مـن المصـادر (العاني, 1993; Beuchat, 1992 ; Jernejc and Cimerman, 2001)**.**

2 - 7- الغربــــلة Screening

يقصد بعملية الغربلة إجراء مقارنة بين عدد كبير من العزلات الفطرية في صفة محددة كصفة إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز بهدف تحديد أي منها أكثر فعالية وقدرة على التعبير عن تلك الصفة وذلك من خلال اختبارات معينة لانتقاء العزلة الأكثر إنتاجاً واستكمال الدراسة المخبرية عليها واستخدامها لاحقاً على نطاق تجاري (عمر, 2006).

2-7- 1- الغربلة الأوليــة Primary screening

تسمى هذه المرحلة أحياناً بالمرحلة شبه الكمية (Semi – quantitative) وهو اختبار يتسم بالسرعة والدقة إلى حد ما, وفي هذه المرحلة تزرع العزلات الفطرية في أوساط زرعية صلبة تحتوي على الغلوكوز كمادة أساسية في الوسط ثم يقارن بين العزلات من خلال مساحة الهالة الملونة التي تحدثها العزلات عند استخدام كاشف مؤلف من أورثو أنيزيدين وأنزيم بيروكسيداز والتـــي تتناســب طـــرداً مـــع قابليـــة العـــزلات علـــى إنتـــاج الأنـــزيم المـــذكور (Witteveen *et al*., 1990).

2-8- الفطريـــــــات : Fungi

تعـرف الفطريـات بأنهـا مخلوقـات حقيقيـة النـواة, غيـر متحركـة, ولا تحتـوي علـى صـبغة اليخضـور, معظمهـا عديد الخلايا ومنهـا مـا هـو وحيد الخليـة, تختلف في أشكالها وتراكيبهـا فبعضـها يتكون من خلية واحدة كالخميرة والكثير منها عديد الخلايا, وتنتظم في خيوط فطريـة مفردها (الخيط الفطري) ومجموع هذه الخيوط يشكل الغزل الفطري وهذا إما أن يكون مقسماً بجـدر عرضـية (Septa) ويحتـوي كـل قسـم (خليـة) علـى نـواة واحـدة أو أكثـر, وإمـا أن يكـون مدمجاً خلوياً حيث يحتوي البروتوبلازم على أنوية بدون حواجز وتحتوي جدر خلايا الفطريات على السيليلوز ومادة الكيتين أو أحدهما.

تعتمـد الفطريـات فـي تغذيتها علـى المـواد العضـوية, حيـث تقوم بهضـم هذه المـواد خـارج الخلايا وذلك بإفراز أنزيمات هاضمة ثم تقوم بامتصاص هذه المواد المهضـومة, ويمكن تقسيمها من حيث تغذيتها (الرحمة, 1998) إلى:

- فطريات مترممة وهي الفطريات التي تعيش على مواد عضوية متحللة سواء كانت بقايا نباتيـة أو حيوانيـة, حيث تحلل هذه المـواد ثم تمتصـها مثل فطـر البنسليوم وعفن الخبـز (إجبارية الترمم) وفطريات التفحم (اختيارية الترمم).
- فطريات متطفلة وهي الفطريات التي تعيش متطفلة على مخلوقات حية, حيث تمتص الغذاء من أجسام المخلوقات الحية المتطفلة عليها وتسبب أمراضاً مختلفة مثل البياض الزغبي (إجبارية التطفل) والفيوزاريوم (اختيارية التطفل).
- فطريات متكافلة وهي فطريات تعيش بطريقة التكافل (تبادل المنفعة) مع مخلوقات حية أخرى, ومن أمثلتها الأشنات وهي عبارة عن فطر وطحلب.

2-8-1 - تصنيف الفطريات حسب التكاثر الجنسي:

1 - قسم الفطريات البيضية **Phycomycetes:** مثل فطريات البياض الزغبي.

2 - قسم الفطريات الزيجوتية **Zygomycota:** مثل فطر عفن الخبز.

3 - قسم الفطريات الزقية **Ascomycetes:** مثل البنسليوم والكمأة والخميرة.

4 - قسم الفطريات البازيدية **Basidiomycetes:** مثل فطر عيش الغراب والعرجون.

5 - قسم الفطريات الناقصة **Deuteromycetes:** مثل الفيوزاريوم وبعض أنواع البنسليوم والأسبرجيللوس (عمار, 2002).

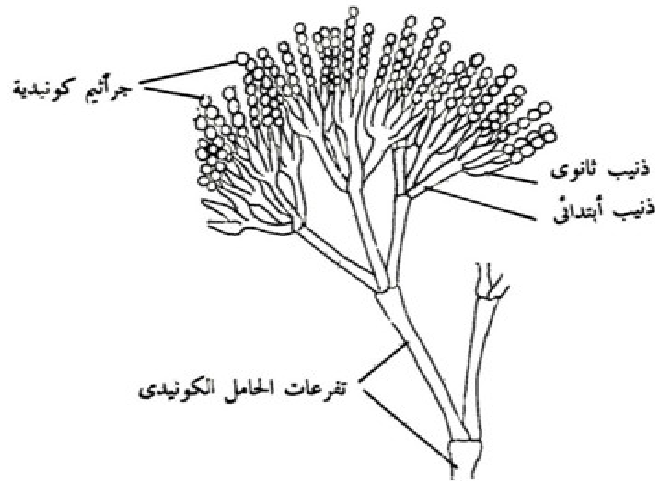
2-8-2- جنس *Penicillium* :

يعتبر الجنس *Penicillium* من أوسع الفطور انتشاراً في الطبيعة حيث تصل عدد أنواعه إلى 200 نوع, جميعها تعيش مترممة على المواد العضوية والألبسة والورق وكل مادة تتعرض للرطوبة ويتوفر عندها الحرارة المناسبة, وهو يشابه إلى حد كبير فطر *Aspergillus* في مدى انتشاره ويسبب أضراراً شديدة لثمار الحمضيات مشكلاً عليها العفن الأزرق والأخضر, أما الصفات المزرعية للفطر موضحة في الشكل (2) حيث يتميز بمشيجة متفرعة, مقسمة, متشابكة, ملونة أو عديمة اللون, وتتشكل الأبواغ الكونيدية بسلاسل على حوامل بوغية هوائية, مقسمة بجدر مستعرضة ومتفرعة إلى فريعات تشبه إلى حد كبير الفرشاة أو المكنسة *Penicillus* ومنها جاء الاسم اللاتيني, وينشأ على فريعاتها سلاميات أو ذنيبات صغيرة تدعى الخلايا القارورية Phialides تتركز عليها الأبواغ في سلاسل ويعتمد على شكل الحامل البوغي ونمط تفرعه وتماثله أو عدم تماثله في التمييز بين أنواع *Penicillium* وتصنيفها, وتبعاً لذلك وبحسب ماجاء في (Samson *et al*., 2000) يرتبط تشخيص كل نوع من الأنواع التابعة لجنس *Penicillium* بالعديد من الصفات المورفولوجية منها لون مستعمرة الفطر وشكل الحامل الكونيدي وطريقة تفرعه وتماثله أو عدم تماثله (حامل كونيدي أحادي الصف Monoverticillate, ثنائي الصف Biverticillate, عديد الصفوف Polyverticillate), وصفات الأبواغ من حيث الشكل واللون والحجم, وتستخدم الأوساط الزرعية Potato Dextrose Agar (PDA) وCzapek Dextrose Agar (Cz-Dex.A) لتنمية الفطور التابعة لهذا الجنس عليها.

يعد الجنس *Penicillium* من الفطريات الصناعية الهامة من حيث التطبيقات الواسعة في مجالات متعددة غذائية وصيدلانية نذكر منها تخمير الجبن الأبيض وتحويلها إلى جبن كاممبر أو روكفور, إنتاج المضادات الحيوية والأحماض العضوية مثل Citric acid و Gluconic acid, وإنتاج الأصبغة وفيتامين D (عمار, 2002).

ويصنف فطر *Penicillium* كما يلي:

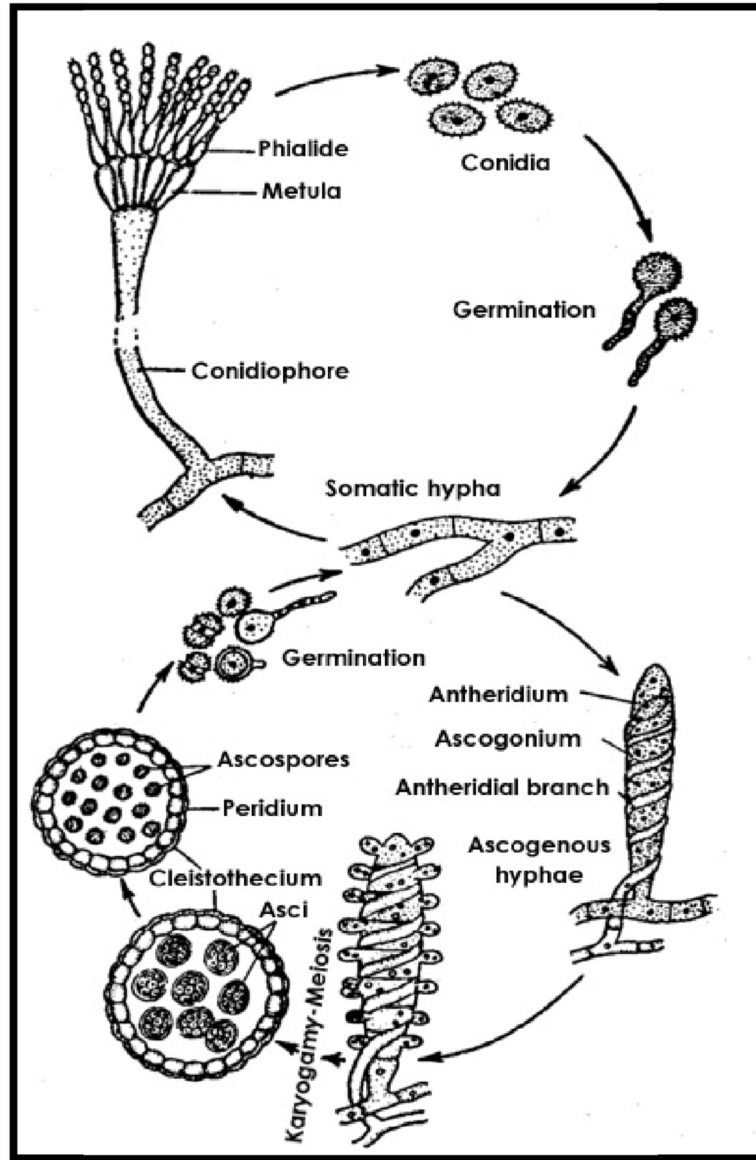
المملكة	Fungi
الشعبة	Ascomycota
الصف	Eurotiomycetes
الرتبة	Eurotiales
العائلة	Trichocomaceae
الجنس	*Penicillium*



الشكل (2) يبين جنس *Penicillium* (فضول ونفاع, 2009)

3-8-2- التكاثر عند فطر *Penicillium*:

يتكاثر فطر *Penicillium* لاجنسياً بواسطة الأبواغ الكونيدية والتي تتكون بآلية معينة, حيث يتكون في قمة الفياليد أنبوبة صغيرة ترحل إليها نواة نشأت عن انقسام نواة الفياليد, يلي ذلك تكوين حاجز يفصل قاعدة الأنبوبة عن طرف الفياليد فتتكون خلية جديدة هي بداية تكون البوغ الكونيدي, حيث تحاط النواة بجزء من الهيولى وتفرز الخلية جداراً لها, وعند نضج البوغ الكونيدي قد يتحد جداره أو جزء منه بجدار الفياليد, وتستمر الفياليدات بتكوين أبواغ جديدة تنتظم في سلاسل, حيث يكون أكبرها سناً أبعدها عن الفياليد, وتكون الأبواغ وحيدة النواة وأحياناً عديدة النوى, أما التكاثر الجنسي عند أنواع *Penicillium* غير معروف تماماً في معظمها سوى عند حوالي خمس وعشرين نوعاً وتكون الثمرة الزقية من الطراز المغلق, وكلها أنواع متماثلة المشائج باستثناء النوع *P. tuteum* فهو متخالف المشائج, يكون عضو التأنيث أو مولد الزق في البداية أحادي النواة, ثم تنقسم نواته العديد من الإنقسامات ليصبح فيه عدد كبير من النوى يمكن أن يصل عددها إلى 64 نواة, ويظهر العضو المذكر من خيط مجاور على شكل فرع يلتف حول عضو التأنيث ويكون وحيد النواة, ثم ينفصل الجزء العلوي من الفرع بواسطة حاجز عرضي مشكلاً عضو مذكر أو أنثريدة أحادية النواة, تذوب الجدر الفاصلة عند نقطة إلتقاء طرف العضو المذكر بمولد الزقاق ويحدث الإندماج الهيولي, وتنمو بعد ذلك خيوط فطرية عقيمة متشابكة حول العضو المذكر ومولد الزقاق المندمجين ليتكون الجزء العقيم من الثمرة الزقية المغلقة, ويلاحظ في بعض الأنواع أن الأنثريدة عديمة الوظيفة ويقتصر دور التكاثر الجنسي على الخلية الزقية المولدة أو عضو التأنيث (Ascogonium) فقط (فضول ونفاع, 2009).



الشكل (3) تبين التكاثر الجنسي واللاجنسي عند فطر Penicillium

(Samson *et al*., 2000)

2-9- العوامل المؤثرة في إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز:

2-9-1 - تأثير درجة الحرارة : Effect of Temperature

تؤثر درجة الحرارة في مختلف الفعاليات الحيوية للخلية, لذلك فإن تكون المنتجات الأيضية في الأحياء الدقيقة يعتمد بشكل كبير على درجة الحرارة, وكما هو الحال في معظم التفاعلات الكيميائية فإن سرعة التفاعلات الأنزيمية تزداد مع ارتفاع درجة الحرارة ضمن المجال الحراري الذي يكون فيه الأنزيم ثابتاً ومحتفظاً بكامل فعاليته, وقد تبين أن لكل أنزيم درجة حرارة مثلى يكون عندها نشاط الأنزيم أعلى مايمكن ويقل النشاط تدريجياً كلما ابتعدنا عن درجة حرارته المثلى (الخياط ومحمد, 2001). ومن الجدير بالذكر أنه في حال أريد حفظ أنزيم ما لمدة طويلة فيمكن أن يحفظ مبرداً على درجة حرارة عشرين درجة تحت الصفر المئوي وعندما يراد استخدامه مرة أخرى فإن نشاطه يعود مرة أخرى عند رفع درجة حرارته إلى درجة الحرارة المناسبة للتفاعل الإنزيمي. ومن الحقائق المثبتة من قبل الكثير من الباحثين هو أن درجة الحرارة المثلى لنمو الأحياء الدقيقة ليس من الضروري أن تكون ذاتها المثلى للتحولات الأيضية لتلك الأحياء, وتختلف درجة الحرارة المثلى والملائمة لثبات الأنزيم ونشاطه من أنزيم لآخر (السواح, 2002).

أظهرت معظم الدراسات التي تمت على إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من الفطريات على أن درجة الحرارة المثلى كانت ضمن مجال يتراوح ما بين 25˚ م و37˚ م (Bankar *et al*., 2009), وقد تبين أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج الأنزيم من فطر *Aspergillus niger* كانت 37˚ م وزيادة هذه الدرجة إلى 66˚ م أدت إلى انخفاض نشاط الأنزيم (El-sherbeny *et al*., 2005), وهذا يتوافق مع الحرارة المثلى لإنتاج الأنزيم من *P. pinophilum & Talaromyces flavus* والتي تتراوح ما بين 30˚ م و 40˚ م (Kim *et al*.,1990; Rando *et al*., 1997), بينما كان أفضل إنتاج للأنزيم من فطر *P. notatum* و *P. fellutamus* على درجة حرارة 30˚ م (Sabir *et al*., 2007; Manivannan and Kathiresan, 2007), وباختبار تأثير درجة الحرارة على إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من فطر *Aspergillus niger* ضمن مجال يتراوح ما بين 22˚ م و 32˚ م تبين بأن درجة الحرارة المثلى هي27.5˚ م (Hatziuilcolaou and Macris., 1995). كما أعطى فطر *P.chrysogenum* في دراسة أخرى أعلى فعالية أنزيمية عند درجة حرارة 20˚ م (Ragini *et al*., 2010).

2-9-2- تأثير درجة الحموضة (pH): Effect of pH

تلعب درجة حموضة وسط النمو دوراً هاماً في التغيرات الشكلية للكائن الحي الدقيق وتؤثر تأثيراً مباشراً في نشاط الأنزيمات الخارجية وعلى التمثيل الغذائي للفطر, بل وتعتبر درجة الحموضة عاملاً معنوياً يؤثر في فيزيولوجية الكائن الحي الدقيق عن طريق تأثيره في انحلالية المواد المغذية في الوسط وفعالية الأنزيم, ويمكن أن يختلف رقم الحموضة المثالي لإنتاج الأنزيم عن رقم الحموضة المثالي للنمو, وبصفة عامة تناسب البيئة المائلة للحموضة إنبات الأبواغ, بل وتشجعها على النمو خلال المراحل الأولى لتكوين مستعمرة فطرية حديثة, بينما يناسب الوسط المائل للقلوية نمو معظم أنواع البكتريا (أحمد وآخرون, 1999) , وإن لكل إنزيم رقم هيدروجيني pH معين يكون الإنزيم عنده أكثر نشاطاً ويسمى الرقم الهيدروجيني المثالي وإذا قل عنه أو زاد فان نشاط الإنزيم يقل إلى أن يتوقف وذلك عند وصوله الرقم الهيدروجيني الأدنى أو الأقصى حيت يتغير التركيب الطبيعي للإنزيم في هذه الحالة (السواح, 2002).

تميزت معظم السلالات المستخدمة تجارياً لإنتاج غلوكوز أوكسيداز بدرجة حموضة مثالية تراوحت ما بين 6 و 7 (Bankar *et al*., 2009), وأشارت معظم الدراسات إلى أن أفضل إنتاج للأنزيم كان عند درجة pH تعادل 7 (Kona *et al*., 2001; Miron *et al*., 2002), بينما حرر *P. fellutatanum* أكبر كمية من الأنزيم على درجة pH تساوي 6.5 (Manivannan and Kathiresan, 2007), وانخفضت الفعالية الأنزيمية عند انخفاض pH إلى أقل من 4.5 (Simpson *et al*., 2007). وفي دراسة أخرى أعطى *فطر* *P. chrysogenum* أعلى فعالية أنزيمية على درجة حموضة (pH) تعادل 6 علماً أن الأمثلة تمت ضمن مجال pH تراوح ما بين 4 و 8 (Ragini *et al*., 2010). بينما اختلفت درجة الحموضة المثالية في بحث أجري في الباكستان على أمثلة ظروف إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من فطر *Aspergillus niger* (Hafiz *et al*., 2003) حيث استخدم فيه درجات حموضة مختلفة (2 , 3 , 4, 5 ,6) فكانت أعلى فعالية أنزيمية عند درجة pH تعادل 4 وهذه النتيجة تتفق مع (Rando *et al*., 1997) الذي أنتج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من فطر *p. pinophilum* وكانت درجة الحموضة المثلى للإنتاج تتراوح ما بين 4 و 4.6.

3-9-2- تأثير فترة الحضانة Effect of Incubation Time

تعد مدة التحضين من العوامل الهامة التي تؤثر في عملية التخمر, ولاسيما على النمو والتخليق الحيوي للأنزيمات الميكروبية, وتختلف الفترة المثلى للوصول إلى الفعالية العظمى للأنزيمات المستخلصة من الأحياء الدقيقة باختلاف الكائن الحي الدقيق ونوع الوسط الزرعي, ففي دراسة أجريت في الباكستان على إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من فطر *P. notatum* أعطى الفطر أعلى فعالية أنزيمية عند التحضين لمدة 72 ساعة وعلى درجة حرارة 30° م, بينما بدأ نشاط الأنزيم بالإنخفاض تدريجياً بعد ذلك (Sabir *et al*., 2007), في حين أعطى فطر *Aspergillus niger* أعلى فعالية للأنزيم الداخلي والخارجي عند فترة تخمير لوسط إنتاج الأنزيم بلغت 48 ساعة (Fiedurek *et al*., 1997), وازدادت فعالية الأنزيم المنتج من *P. fellutatanum* ووصلت إلى أعلى قيمة لها عند التحضين لمدة 96 ساعة على درجة حرارة 30° م ودرجة حموضة pH=6.5 حيث بلغت عشرة أضعاف قيمة الفعالية الأنزيمية المتحصل عليها عند التحضين لمدة 24 ساعة على درجة الحرارة والحموضة ذاتها (Manivannan and Kathiresan, 2007), وفي دراسة أجراها (Hamid *et al*., 2003) على فطر *Aspergillus niger* ازدادت فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز تدريجياً بدءاً من 12 ساعة تحضين لتصل إلى أقصى قيمة لها عند التحضين لمدة 36 ساعة ثم عاودت بعد ذلك بالإنخفاض التدريجي, وفي دراسة أخرى أجريت على *Aspergillus niger* كان أفضل إنتاج للأنزيم عند 96 ساعة من التحضين وانخفضت فعالية الأنزيم وكافة المحتوى البروتيني بشدة عند إطالة فترة التحضين لأكثر من 96 ساعة (Bankar *et al*., 2009) دون أن يحدث أي تغيير على الكتلة الحيوية ويعود السبب في ذلك إلى استهلاك المغذيات في الوسط أو تراكم المنتجات السامة للكائن الحي الدقيق في الوسط (Stanbury *et al*., 1997). وفي دراسة أخرى قدرت فعالية الأنزيم بعد كل 24 ساعة من التحضين و لمدة 120 ساعة فكانت النتيجة أن أعلى فعالية أنزيمية كانت عند 72 ساعة من التحضين على درجة حرارة 30° م, وانخفضت الفعالية الأنزيمية عند التحضين لمدة أطول من 72 ساعة لتبلغ أدناها عند التحضين لمدة 120 ساعة (Ragini *et al*., 2010).

2 -9 -4 - تأثير نسبة الغلوكوز Effect of Glucose percent

يمثل مصدر الكربون خلال التخمرات الميكروبية مصدراً هاماً للطاقة وعنصراً رئيسياً في بناء الخلية وتركيب متعدد السكاريد, ويؤثر استقلاب الكربون في عملية التكوين الحيوي وفي إنتاج مستقلبات أولية وثانوية, لذلك يعتبر وجوده في الوسط أمراً بالغ الأهمية للحصول على نواتج الاستقلاب المطلوبة (Stanbury *et al*., 1997).

اختبرت قدرة 84 سلالة من جنس *Penicillium* على إنتاج غلوكوز أوكسيداز وتبين أن *P.chrysogenum* ,*P.italicum* , *P.expansum* و *P. variabile* أعطت أعلى فعالية للأنزيم عند استخدام الغلوكوز كمصدر للكربون(Petruccioili *et al*., 1993), كما درس تأثير10 مصادر كربونية مختلفة على إنتاج غلوكوز أوكسيداز من *P. variabile* وهي (غلوكوز, غالاكتوز, آرابينوز, مانوز, سكروز, مالتوز, مانيتول, وغليسرول) فأعطى استخدام الغلوكوز والمانوز أعلى مستوى من غلوكوز أوكسيداز وكانت النسبة 8% هي المثلى لإنتاج أعلى مستوى من الأنزيم (Petruccioli *et al*., 1997) وهذا يتفق مع ماتوصل إليه (Rogalsk*i et al*., 1988) عند استخدام الغلوكوز بتركيز 8% أعطى فطر *Aspergillius niger* أعلى فعالية لأنزيم غلوكوز أوكسيداز, في حين أن التركيز الأعلى من 8% للغلوكوز قلل من الكتلة الخلوية و pH الوسط وكمية الأنزيم المنتجة (Kusai *et al*., 1960). وكانت النسبة 10% هي المثلى في دراسة أخرى أجراها (Khurshid *et al*., 2011) على أمثلة ظروف إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز المنتج من فطر *Aspergillius niger*, وفي دراسة أخرى تم دراسة تأثير سكاكر مختلفة (غلوكوز, سكروز, لاكتوز, سيللوز, مانيتول, وفركتوز) على إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من فطر *P.chrysogenum*, حيث أعطى الغلوكوز أعلى فعالية أنزيمية بينما أعطى السيللوز أدنى فعالية أنزيمية (Ragini *et al*., 2010), كما تفوق المولاس على المصادر الكربونية الأخرى التي تم اختبارها بما فيها الغلوكوز في دراسة أجراها (Hatzinikolaou and Macris, 1995) على فطر *Aspergillius niger* وكانت النسبة المثلى لاستخدام المولاس هي 3%.

2-9- 5- تأثير سرعة التهوية Effect of Aeration Speed

تعد التهوية والتحريك عاملان هامان في التخمرات الهوائية وذلك لتأمين الأوكسجين اللازم لنمو الفطر وإتمام عملية التخمر (Zetelaki and Vas , 1968 ; Klein *et al* ., 2002) أما التحريك فهو ضروري لأنه يزيد من فعالية عملية التهوية عن طريق زيادة نسبة الأوكسجين المنحل وبالتالي زيادة معدل النمو وإنتاج الأنزيم (Zetelaki *et al*., 1970; Fiedurek and Gromada., 2000), وبمقارنة فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز لمزرعة فطر تحرك بسرعة 460 و700 لوحظ أن فعالية الأنزيم عند سرعة تحريك 700 دورة/دقيقة كانت أعلى بـ 20-24% من فعالية الأنزيم بسرعة تحريك460 دورة/دقيقة (Bankar *et al*., 2009), وهذا يعني أن ازدياد الفعالية الأنزيمية يتناسب طرداً مع سرعة التهوية أو التحريك, وهذا يناقض ماتوصل إليه (Jafari *et al*., 2007) في دراسة أجروها على إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من فطر *Aspergillius niger* حيث استخدموا في دراستهم سرعات تحريك لوسط الإنتاج تراوحت من 150 دورة/دقيقة إلى 400 دورة/دقيقة, فلوحظ ازدياد الفعالية الأنزيمية بشكل ملحوظ بزيادة سرعة التهوية من 150 دورة/دقيقة إلى 300 دورة/دقيقة التي اعتبرت السرعة المثلى لإنتاج الأنزيم, لتعود بعد ذلك الفعالية بالانخفاض بزيادة سرعة التهوية وبالتالي كانت العلاقة بين سرعة التهوية وفعالية الأنزيم طردية في البداية حتى بلغت 300 دورة/دقيقة ثم تحولت بعد ذلك إلى علاقة عكسية, وكذلك كانت السرعة 400 دورة /دقيقة هي المثلى في دراسة أخرى أجراها (Petrucoili *et al*., 1995) والتي درسوا فيها تأثير سرعات تحريك مختلفة لوسط إنتاج الأنزيم من فطر *P. variabile* تراوحت من 300 دورة/دقيقة إلى 900 دورة/دقيقة, وبالتالي كانت العلاقة بين سرعة التهوية وفعالية الأنزيم طردية في البداية حتى بلغت 400 دورة/دقيقة ثم تحولت بعد ذلك إلى علاقة عكسية.

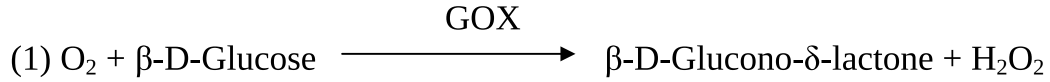
10-2- تقدير فعالية غلوكوز أوكسيداز:

يوجد طرائق عديدة لتقدير فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز وهذه الطرائق تعتمد على قاعدة أساسية وهي أكسدة الغلوكوز بوجود الأوكسجين إلى غلوكونو لاكتون وبيروكسيد الهيدروجين, يؤكسد بيروكسيد الهيدروجين المتكون المادة الكاشفة المستخدمة وبوجود البيروكسيداز Horse-radish-Peroxidase (HRP) فيحدث كنتيجة لعملية الأكسدة تغير لوني, يقاس التغير اللوني باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Gerristen *et al*., 2001).

يستخدم في تقدير فعالية الأنزيم بهذه الطريقة كاشفان هما:

2,2-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat (ABTS) و O-dianisidine (Witt *et al*., 1998; Sukhacheva *et al*., 2004).

يعطي ABTS لون أزرق مخضر كناتج لأكسدته بواسطة بيروكسيد الهيدروجين المتكون و يقاس باستخدام المطياف الضوئي على طول موجة 420 نانومتر (Fiedurek and Gromada, 1997) كما يوضح التفاعلين (1و2):



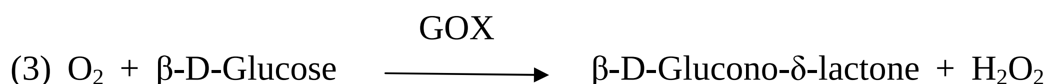
$$(1)\ O_2 + \beta\text{-D-Glucose} \xrightarrow{GOX} \beta\text{-D-Glucono-}\delta\text{-lactone} + H_2O_2$$

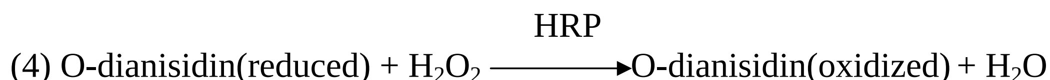


$$(2)\ ABTS(reduced) + 2H_2O_2 \xrightarrow{HRP} ABTS\ (oxidized) + 2H_2O$$

بينما يعطي O-dianisidine لوناً بنياً عند أكسدته بواسطة بيروكسيد الهيدروجين المتكون ويقاس باستخدام المطياف الضوئي على طول موجة 436 نانومتر (Ciucu and Patoescua, 1984; Witteveen *et al*., 1990).

كما هو موضح في التفاعلين (3 و4):





إضافة إلى هذه الطرائق التي تعتمد على قياس فعالية الأنزيم اعتماداً على كمية H_2O_2 الناتج فهناك طريقة أخرى تعتمد على قياس فعالية الأنزيم اعتماداً على كمية الغلوكوز المتأكسدة وهي استخدام كاشف داي نيتروسايسيليك أسيد (DNS), ويقاس التغير اللوني باستخدام المطياف الضوئي على طول موجة 540 نانومتر, وتقدر وحدة الفعالية الأنزيمية على أساس كمية الأنزيم التي تحول 1µg غلوكوز إلى غلوكونيك أسيد خلال 30 دقيقة وعلى الدرجة ˚30 م (Manivannan and Kathiresan, 2007).

مواد البحث و طرائقه

Materials and Methods

3- مواد البحث وطرائقه :

3-1- المواد :

3-1-1 - جمع العينات:

جمعت عينات عشوائية مختلفة من مواد غذائية وهواء وترب محلية (20 عينة) تشمل كلاً من المربى (4 عينات), والعصير (3 عينات), والخبز (1 عينة), والبسكويت (1 عينة), وثمار فواكه (5 عينات), والتربة (4 عينات), والهواء (2 عينة) خلال عامي 2009 و 2010. عزلت أنواع فطور *Penicillium* منها استناداً إلى الشكل الظاهري والفحص المجهري حسب (Samson *et al.*, 2000) وأعطيت العزلات رموزاً مرقمة.

3-1-2- المستنبتات الغذائية المستخدمة:

3-1-2-1 - وسط أغار البطاطا و الدكستروز لتنمية الفطور Potato Dextrose Agar (PDA):

حضر وسط PDA حسب تعليمات الشركة المصنعة Himedia بإذابة 39 غرام من الوسط في لتر من الماء المقطر وبعد ضبط درجة الـ pH على 6.6, وعقم الوسط على درجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة على ضغط 1.5 كغ/سم^2 ثم برد إلى درجة حرارة 45°م ووزع في أطباق بتري معقمة وترك حتى التصلب.

3-1-2-2- وسط تشابيك آغار:

حضر هذا الوسط حسب (Pitt and Hoking, 1997) ويتكون من:

سكروز	30 غ
نترات الصوديوم $NaNO_3$	1 غ
فوسفات البوتاسيوم الثنائية K_2HPO_4	1 غ
كلور البوتاسيوم KCl	0.5 غ
فوسفات المغنزيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$	0.5 غ
كبريتات الحديدي المائية $FeSO_4.7H_2O$	0.01غ
آغار	15غ
ماء مقطر	1000مل

وضبط الـ pH النهائي على 6.2 ثم عقم الوسط على درجة 121°م لمدة 15 دقيقة على ضغط 1.5 كغ/سم^2 ثم برد إلى درجة حرارة 45°م و وزع في أطباق بتري معقمة وترك حتى التصلب.

3-2-1-3– وسط اختبار الفعالية الأنزيمية:

حضر الوسط وفق طريقة (Witteveen *et al*., 1990) والذي يتكون من:

نترات الصوديوم $NaNO_3$	6 غ/ل
فوسفات البوتاسيوم الأحادية KH_2PO_4	1.5 غ/ل
كلور البوتاسيوم KCl	0.5 غ/ل
كبريتات المغنزيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$	0.5 غ/ل
كبريتات الحديدي المائية $FeSO_4.7H_2O$	0.01 غ/ل
أورثو أنيزيدين O-anisidine	0.3 غ/ل
غلوكوز Glucose	9 غ/ل
آغار Agar	15 غ/ل
كلوريد المنغنيز المائي $Mncl_2.4H_2O$	5 ميكروغرام/ل
كبريتات الزنك المائية $ZnSO4.7H_2O$	35 ميكروغرام/ل
كبريتات النحاس المائية $CuSO_4.5H_2O$	25 ميكروغرام/ل

وزع الوسط على دوارق مخروطية سعة 250 مل بمعدل 150 مل لكل دورق .ثم عقمت الدوارق على درجة 121°م لمدة 15 دقيقة على ضغط 1.5 كغ/سم^2 ثم بردت الدوارق على درجة حرارة 45°م وصبت الأوساط في أطباق بتري معقمة وتركت حتى تصلبها.

3-1-2-4- الوسط المستخدم لإنتاج غلوكوز أوكسيداز :

حضر الوسط حسب (El-Enshasy, 1998) ويتكون من:

نترات الصوديوم $NaNO_3$	3غ
فوسفات البوتاسيوم الثنائية K_2HPO_4	1غ
كبريتات المغنزيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$	0.5غ
كلور البوتاسيوم KCl	0.5غ
كبريتات الحديدي المائية $FeSO_4.7H_2O$	0.01 غ
مستخلص الخميرة Yeast extract	2غ
غلوكوز Glucose	80غ
ماء مقطر	1000مل

3-1-3- المواد الكيميائية المستخدمة:

الجدول (2) يبين أهم المواد الكيميائية المستخدمة في تنفيذ البحث

المواد الكيميائية	الشركة المصنعة
D- Glucose غلوكوز	SIGMA
NaNO3 نترات الصوديوم	SIGMA
K_2HPO_4 فوسفات البوتاسيوم الثنائية	SIGMA
$MgSO_4.7H_2O$ كبريتات المغنزيوم المائية	SIGMA
KCl كلور البوتاسيوم	SIGMA
$FeSO_4.7H_2O$ كبريتات الحديدي المائية	SIGMA
Yeast extract مستخلص الخميرة	SIGMA
O-anisidin	MERCK
Peroxidase	MERCK
DNS كاشف داي نيترو ساليسيليك أسيد	MERCK
$Mncl_2.4H_2O$ كلوريد المنغنيز المائي	SIGMA
$ZnSO4.7H_2O$ كبريتات الزنك المائية	SIGMA
$CuSO_4.5H_2O$ كبريتات النحاس المائية	SIGMA
PDA أغار البطاطا والدكستروز	HIMEDIA

4-1-3 - الأجهزة المستخدمة :

الجدول (3) يبين أهم الأجهزة المستخدمة في تنفيذ البحث

الجهاز المستخدم	الشركة المصنعة
غرفة زرع مزودة بالأشعة فوق البنفسجية Laminar flow	Bio Air - Italy
الصاد الموصد Autoclave	Shenan LDZX -50 FB- China
حاضنة هزازة Rotary shaker	New Brunswick Scientific – U.S.A
مثقلة مبردة Bio Fuge	Heraeus – Germany
مقياس الرقم الهيدروجيني pH-meter	Hanna – Romania
حاضنة Incubator	Lab Tech – Koria
مقياس الضوء الطيفي Spectrophotometer	Biochrom Libra S12
ميزان حساس Sensitive balance	Mettler Toledo – Taiwan
ميزان Balance	Mettler Toledo – Taiwan
مجهر ضوئي Microscope	Olympus – Philippines
مسخن مع محرك مغناطيسي	Boeco – Germany
جهاز تقطير الماء	G F L – Germany

3-2- طرائق العمل :

3-2-1- طريقة عزل الفطر:

3-2-1-1- عزل الفطر من التربة باستخدام طريقة تخفيف محلول التربة حيث وضعت كمية 10 غرامات من التربة المغربلة ضمن دورق مخروطي سعة 250 مل يحوي على 90 مل من الماء المقطر ورجت بشكل متقطع لمدة 30 دقيقة ثم رُشحت محتوياته للحصول على تخفيف1/10. بعد ذلك أجريت التخفيفات بأخذ 1 مل من كل تخفيف مع 9 مل من الماء المقطر والمعقم للحصول على التخفيف الأدنى تركيزاً مع مراعاة الرج والتجانس قبل أخذ الحجم المحدد وبهذه الطريقة حضرت التخفيفات (10^{-2}, 10^{-3} , 10^{-4} و 10^{-5}). أخذ 1 مل من كل تخفيف ووضع في طبق بتري فوق مستنبت PDA ثم حرك الطبق حركة رحوية لضمان توزيع التخفيف على سطح المستنبت وحضرت خمسة أطباق بتري لكل تخفيف ثم أغلق كل طبق بواسطة البرافين لمنع التلوث. وُضعت الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 1±25ْ م لمدة أسبوع مع الفحص يومياً بعد اليوم الثالث.

3 -2 -1 -2 - عزل الفطر من الهواء عن طريق وضع طبق بتري حاوي على وسط PDA مفتوحاً لمدة 10-20 دقيقة وحضن بعد إغلاقه على درجة حرارة 25ْ م ولمدة خمسة أيام حسب طريقة (Samson *et al*., 2000).

3-2-1-3- عزل الفطر من البسكويت والفواكه بأخذ جزء من النموات الفطرية الموجودة على سطح العينة وخططت فوق مستنبت PDA في طبق بتري وحضن بعد إغلاقه على درجة حرارة 25ْ م ولمدة خمسة أيام.

3-2-1-4 - عزل الفطر من المربى و العصير عن طريق إضافة 25غ من المربى أو العصير إلى 1000مل وسط آغار البطاطا والدكستروز وهو بحالة سائلة, وبعد التصلب حضن على درجة حرارة 25ْ م لمدة خمسة أيام وهي مدة كافية لنمو الفطر على سطح الوسط حيث نقل بعدها الفطر وخطط فوق مستنبت PDA.

3-2-2- تشخيص عزلات الفطر:

صنفت الفطور بطريقة التحميل بالنشر بواسطة اللاكتوفينول واستناداً إلى الصفات الشكلية مثل لون مستعمرة الفطر وشكل الحوامل الكونيدية وطريقة تفرعه وتماثله أوعدم تماثله (حامل كونيدي أحادي الصف Monoverticillate, ثنائي الصف Biverticillate, عديد الصفوف Polyverticillate) وصفات الأبواغ من حيث الشكل واللون حسب (Samson *et al*., 2000).

3 -2 -3 - الكشف عن إنتاج غلوكوز أوكسيداز:

لقحت أطباق بتري الحاوية على وسط اختبار الفعالية الأنزيمية (3-1-2-3) بقطر 7 مم مأخوذة من المستعمرات النامية علي بيئة أغار البطاطا والدكستروز (PDA) وبعمر(5) أيام ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25°م لمدة أربعة أيام وبواقع ثلاثة مكررات لكل عينة وطبقين بدون تلقيح كشاهد, قيس قطر الهالة المتشكلة بعد غمر الأطباق بمحلول مكون من محلول واقي درجة حموضته pH=7 من فوسفات الصوديوم تركيزه (20mM) وغلوكوز تركيزه (0.1M), وأنزيم بيروكسيداز بتركيز (20µg/mL) وقيس قطر الهالة المتشكلة حول المستعمرات باستخدام مقياس بيكاليسس الرقمي بالميلليمتر(Yu and Zhang , 2004) .

3 -2 -4 - إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز بالطريقة السائلة:

حضر الوسط (3 -1 -2 -4) ثم وزع على دوارق مخروطية سعة 250 مل بمعدل 50 مل لكل دورق, عقمت الدوارق على درجة 121°م لمدة 15 دقيقة على ضغط 1.5 كغ/سم^2, ثم لقح كل دورق حاوي على (50 مل) من الوسط بـ3 مل من معلق بوغي (X1 10^6) بوغة/مل محضر من مزرعة فطر عمرها 7 أيام وحضنت حسب التصميم الإحصائي المعتمد.

3 -2 -5 - استخلاص الأنزيم:

أجريت عملية الطرد المركزي بسرعة 8000 دورة/دقيقة ولمدة 15 دقيقة على الدرجة ْ4 م لفصل الكتلة الحيوية عن السائل الحاوي على الأنزيم والذي أخذ لقياس الفعالية الأنزيمية.

3 -2 -6 - قياس الفعالية الأنزيمية باستخدام المطياف الضوئي:

حضرت محاليل قياسية من سكر الغلوكوز بالتراكيز التالية : 0.5 - 1 - 1.5 – 2 – 2.5– 3 - 3.5 – 4 – 4.5 – 5 مغ/مل, وقيست الامتصاصية لكل تركيز من التراكيز السابقة بغرض الحصول على منحنى قياسي يمثل فيه محور السينات نسبة الغلوكوز مغ/مل ومحور العينات قيم الامتصاص الضوئي.

قيست الفعالية الإنزيمية اعتماداً على طريقة الـ DNS حسب (Gera *et al*., 2008) وذلك بإضافة 0.2 مل سكر غلوكوز (2.5 غ/ل) مع 0.2 مل رشاحة (حاوية على الأنزيم الخام) و 1 مل محلول موقي سترات فوسفات pH=5, و0.6 مل ماء مقطر, وحضنت الأنابيب على درجة حرارة ْ30 م ولمدة 30 دقيقة لإتاحة الفرصة للتفاعل الأنزيمي, ثم نقلت إلى حمام مائي درجة حرارته ْ100م وتركت مدة 5 دقائق لإيقاف التفاعل الأنزيمي, بعدها أضيف كاشف الـ DNS وأعيدت الأنابيب إلى الحمام المائي وتركت مدة 5 دقائق حيث لوحظ تغير لون العينات المختبرة نتيجة ارتباط الكاشف مع السكر الأحادي (الغلوكوز) المتبقي, بردت بعد ذلك الأنابيب ومددت إلى 24 مل باستخدام الماء المقطر, وقيست الإمتصاصية للعينات المختبرة على طول موجة 540 نانومتر بعد تصفير القراءة على عينة الشاهد, وحدد تركيز الغلوكوز

وبالتالي الفعالية الأنزيمية عن طريق المنحنى القياسي. وعرفت وحدة الفعالية الأنزيمية بأنها كمية الأنزيم التي تحول (µg ا) من سكر الغلوكوز إلى حمض غلوكونيك و H_2O_2 خلال 30 دقيقة.

3 -2 -7 - دراسة الظروف المثلى لإنتاج غلوكوز أوكسيداز:

إن الطريقة التقليدية المستخدمة في أمثلة ظروف التجربة عن طريق تثبيت كافة المتغيرات عند مستوى واحد وتغيير متغير واحد فقط في كل مرة عادةً ما تقود إلى استنتاجات خاطئة, لذلك كان لابد من التوصل إلى طريقة إحصائية تعطي نتائج أكثر منطقية من السابقة, وهذا مايحققه التصميم الإحصائي Response Surface Methodology الذي صمم ليس لتقليل عدد التجارب المستخدمة في عملية الأمثلة فحسب وإنما لإعطاء نتائج أكثر منطقية ووضوح من الطريقة التقليدية عن طريق دراسة تأثير كل عامل على حدة وتأثير العوامل المتفاعلة مع بعضها البعض (Pardeep and Satyanarayana, 2006).

3 -2 -7 -1 - تصميم التجربة :

درست الظروف المثلى لإنتاج الأنزيم (درجة الحرارة – درجة الحموضة – مدة التحضين – سرعة التهوية – نسبة الكربوهيدرات) باستخدام البرنامج الإحصائي Minitab والتصميم الإحصائي (Response Surface Methodology (RSM.

درس كل متغير عند 3 مستويات (1+, 0, 1-) كما يلي :

درجة الحرارة : (40, 30, 20) درجة مئوية

درجة الحموضة pH : (8, 6, 4)

مدة التحضين : (5, 3, 1) يوم

سرعة التهوية : (350, 250, 150) دورة/دقيقة

نسبة الكربوهيدرات (الغلوكوز) : (12, 8, 4) %

تضمن التصميم 54 معاملة موضحة في الجدول (4):

الجدول (4) تصميم التجربة RSM

Blocks	درجة الحرارة	درجة الحموضة	مدة التحضين	سرعة التهوية	نسبة الغلوكوز
1	20	4	1	150	4
1	40	8	1	150	4
1	40	4	5	150	4
1	20	8	5	150	4
1	40	4	1	350	4
1	20	8	1	350	4
1	20	4	5	350	4
1	40	8	5	350	4
1	40	4	1	150	12
1	20	8	1	150	12
1	20	4	5	150	12
1	40	8	5	150	12
1	20	4	1	350	12
1	40	8	1	350	12
1	40	4	5	350	12
1	20	8	5	350	12
1	30	6	3	250	8
1	30	6	3	250	8
1	30	6	3	250	8
1	30	6	3	250	8
2	40	4	1	150	4
2	20	8	1	150	4
2	20	4	5	150	4
2	40	8	5	150	4
2	20	4	1	350	4
2	40	8	1	350	4
2	40	4	5	350	4
2	20	8	5	350	4
2	20	4	1	150	12
2	40	8	1	150	12
2	40	4	5	150	12
2	20	8	5	150	12
2	40	4	1	350	12
2	20	8	1	350	12
2	20	4	5	350	12
2	40	8	5	350	12
2	30	6	3	250	8
2	30	6	3	250	8
2	30	6	3	250	8
2	30	6	3	250	8
3	20	6	3	250	8
3	40	6	3	250	8
3	30	4	3	250	8
3	30	8	3	250	8
3	30	6	1	250	8
3	30	6	5	250	8
3	30	6	3	150	8
3	30	6	3	350	8

Blocks	درجة الحرارة	درجة الحموضة	مدة التحضين	سرعة التهوية	نسبة الغلوكوز
3	30	6	3	250	4
3	30	6	3	250	12
3	30	6	3	250	8
3	30	6	3	250	8
3	30	6	3	250	8
3	30	6	3	250	8

3-2-7-2- تحليل التجربة :

يعبر عن العلاقة بين فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز Response (Y) والمتغيرات الخمسة المدروسة Independent variables (X) بمعادلة من الدرجة الثانية كما يلي:

$$Y=a+bX_1+cX_2+dX_3+eX_4+fX_5+gX_1^2+hX_2^2+iX_3^2+jX_4^2+kX_5^2+lX_1X_2+mX_1X_3+nX_1X_4+oX_1X_5+pX_2X_3+qX_2X_4+rX_2X_5+sX_3X_4+tX_3X_5+uX_4X_5$$

حيث:

Y: العامل المدروس Response

a: الثابت constant

b, c, d, e, f: العامل المتغير Linear coefficient

G, h, I, g, k: العامل المتغير مربع square coefficient

L, m, n, o, p, q, r, s, t, u: العوامل المترابطة مع بعضها Interaction coefficient

النتائج و المناقشة
Results & Discussion

4 -النتائج والمناقشة:

1-4 – عزل وتشخيص العزلات الفطرية:

يبين الجدول (5) مصادر العزلات الفطرية وتشخيصها, حيث يلاحظ من الجدول أنه تم عزل 20 عزلة تابعة لجنس *Penicillium* وشخصت مجهريا" باستخدام طريقة التحميل بالنشر باللاكتوفينول لمعرفة الصفات المجهرية للميسليوم والحوامل الكونيدية وشكل الأبواغ استنادا" إلى الصفات الظاهرية للمستعمرة بعد تنميتها على مستنبت تشابيك آغار وتحضينها لمدة سبعة أيام على درجة حرارة 25° م وصنفت العزلات استناداً إلى ماسبق وبحسب (Samson *et al*., 2000) إلى مايلي:

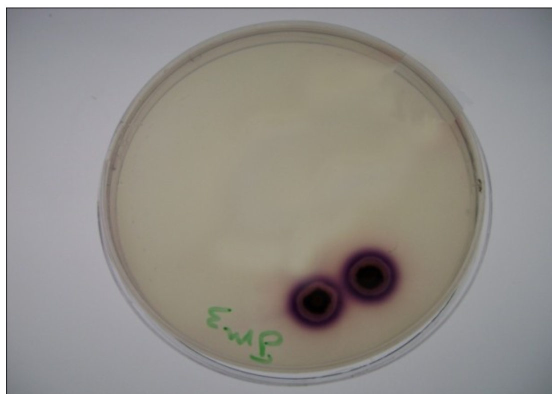
- *P.citrinum* Thom ويتبع له العزلات Jm3, Fr1 ,SS1 حيث كانت المستعمرة مخملية خضراء مزرقة والحوامل الكونيدية عديدة الصفوف تنتهي بـ6 -10 فياليدات مخروطية وأبواغها خضراء دائرية الشكل.
- *P.expansum* Link وتتبع له العزلة Be1 والمستعمرة ذات لون أصفر إلى أخضر مزرق والحوامل الكونيدية أسطوانية تحمل 5 -8 فياليدات قصيرة العنق والأبواغ خضراء شبه دائرية.
- *P.digitatum* Sacc. وتتبع له العزلات Fr4 ,Fr5 والمستعمرة شعاعية بلون أصفر إلى بني مخضر و أهم ما يميزها هي أبواغها البيضوية التي تتوضع بشكل سلاسل.
- *P.griseofulvum* Direckx. وتتبع له العزلة Jm2 والمستعمرة رمادية مخضرة والحامل الكونيدي ثنائي الصف متفرع عشوائيا" يحمل أذنابا" أسطوانية تحمل بنهايتها فياليدات مفلطحة قصيرة و أبواغها خضراء دائرية.
- *P.verrucosum* وتتبع له العزلتان Be2 ,SS4 وتتميز بمستعمرة خضراء تتجمع عليها قطرات وحامل كونيدي ثنائي الصفوف و أبواغ دائرية .
- *P.italicum* Wahmer وتتبع له العزلتان Fr2, Fr3 و المستعمرة خضراء رمادية تتجمع عليها قطرات والحوامل الكونيدية تحمل 2 -4 أذناب وفي نهايتها 3 -6 فياليدات اسطوانية ضيقة العنق و الأبواغ اسطوانية إلى بيضوية الشكل.
- *P. paraherquei* Abe exG.Smith وتتبع له العزلتان Ju1 , SS4 والتي تتميز بمستعمرة مخملية بلون أزرق مخضر بعد تنميتها لمدة سبعة أيام على بيئة تشابيك آغار, والحوامل الكونيدية خشنة تتفرع إلى صف واحد وتحمل 10-4 فياليدات دورقية الشكل, والأبواغ دائرية إلى بيضوية الشكل .

الجدول (5) تشخيص العزلات الفطرية ورموزها ومصدر كل عزلة

رقم العزلة	رمز العزلة	مصدر العزلة	التشخيص	كفاءة إفراز الأنزيم
1	Jm1	مربى تين– منزلي– ريف دمشق	*Penicillium* spp.	-
2	Jm2	مربى مشمش– منزلي – دمشق	*P. griseofulvum*	-
3	Jm3	مربى مشمش – منزلي- دمشق	*P. citrinum*	+
4	Jm4	مربى فريز – منزلي – ريف دمشق	*Penicillium* spp.	+
5	Ju1	عصير مانغو – بامبا – دمشق	*P. paraherquei*	+
6	Ju2	عصير برتقال- منزلي – دمشق	*Penicillium* spp.	-
7	Ju3	عصير برتقال – منزلي – السويداء	*Penicillium* spp.	-
8	Fr1	ثمرة كاكي – ريف دمشق	*P. citrinum*	+
9	Fr2	يوسفي – دمشق	*P. italicum*	-
10	Fr3	برتقالة – دمشق	*P. italicum*	-
11	Fr4	برتقالة – دمشق	*P. digitatum*	-
12	Fr5	بوميلو – دمشق	*Penicillium* spp.	-
13	Be1	بسكويت غلوكوز – دمشق	*P. expansum*	+
14	Be2	خبز – فرن مساكن برزة – دمشق	*P. verrucosum*	-
15	SS1	تربة – كلية الزراعة – دمشق	*P. corylophilum*	-
16	SS2	تربة – كلية الزراعة – دمشق	*Penicillium* spp.	-
17	SS3	تربة – القطيفة – ريف دمشق	*Penicillium* spp.	-
18	SS4	هواء – كلية الزراعة – دمشق	*P. paraherquei*	-
19	SS5	هواء – كلية الزراعة – دمشق	*Penicillium* spp.	-
20	SS6	تربة – مصياف – حماة	*Penicillium* spp.	-
مجموع العينات الكلية				20
عدد العينات الإيجابية				5

4-2- اختبار قابلية العزلات الفطرية على إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز على الأوساط الصلبة:

تبين نتيجة فحص كفاءة إفراز أنزيم غلوكوز أوكسيداز لـ 20 عزلة من فطر *Penicillium* بأن خمسة عزلات فقط تمتلك هذه الكفاءة أي بمعدل 25% من العزلات الكلية المدروسة, كما هو موضح في الجدول (6) حيث أعطت العزلات Jm3, Fr1, Ju1, Be1, Jm4 التابعة لـ *P. citrinum , P. paraherquei ,P. expansum* و *Penicillium* spp. كفاءة إفرازية جيدة تراوح قطر الهالة بالميلليمتر 4.2, 4.1, 3.5, 4.5, 6.3 لكل منها على التوالي, حيث اعطى الفطر (Ju1) *P. paraherquei* أدنى كفاءة لإفراز الأنزيم بقطر هالة 3.5 مم , في حين أعطى فطر(Jm3) *P. Citrinum* أعلى كفاءة إفرازية بقطر هالة6.3 مم كماهو موضح في الشكل (4), أما (Fr1)*P. citrinum* (Be1) *P. expansum* و *Penicillium* spp. (Jm4) فكانت الكفاءة متوسطة, في حين لم تظهر العزلات المتبقية في الجدول (5) كفاءة لإفراز إنزيم غلوكوز أوكسيداز. وقد تبين أن مزارع الأحياء الدقيقة وإن انتمت إلى المجموعة نفسها تتباين وراثياً فيما بينها من حيث خصائص نموها و فعاليتها الإستقلابية ولاسيما بين المزارع والعزلات التي تنتمي إلى الجنس والنوع ذاتهما (*P. citrinum*) وهذا يكون نابعاً عن استجابة العزلات للظروف البيئية فالبناء الوراثي بقدر ما يتصف بالثبات فإنه يتميز بالمقابل بمرونة مذهلة في الإستجابة للتغيرات البيئية, أي أن البيئة تؤثر بشكل جذري في التعبير عن الصفات المظهرية للجينات (Elander and Chang, 1979). وقد تطابقت هذه النتائج مع نتائج (Petruccioli *et al*., 1993) في دراسته حول غربلة أنواع مختلفة من فطر *Penicillium* المفرزة للأنزيم. ويوضح الجدول (6) كفاءة العزلات المنتجة لأنزيم غلوكوز أوكسيداز مقدرة بالميلليمتر اعتماداً على متوسط قطر الهالة حول المستعمرة.



الشكل (4) يبين الهالات المتشكلة حول المستعمرات الفطرية

الجدول(6) يبين كفاءة العزلات المنتجة لأنزيم غلوكوز أوكسيداز اعتماداً على متوسط قطر الهالة مقدرة بالميلليمتر

رقم العزلة	مصدر العزلة	التشخيص	متوسط قطر الهالة(مم)±SD
3	مربى مشمش منزلي – دمشق	*P. citrinum*	6.3±0.12
4	مربى فريز منزلي – ريف دمشق	*Penicillium* spp.	4.2±0.15
5	عصير مانغو – بامبا	*P. paraherquei*	3.5±0.20
8	ثمرة كاكي – ريف دمشق	*P. citrinum**	4.5±0.17
13	بسكويت (غلوكوز) - دمشق	*P. expansum*	4.1±0.18

وبما أن العزلة (Jm3) *P. citrinum* أعطت أعلى كفاءة إفرازية فقد تم اعتمادها لإجراء عملية الأمثلة فيما بعد مع العلم بأن هذا الفطر لم يسبق أن درست مقدرته على إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز في المراجع العلمية من قبل, وقد تمكنا من تسجيله لأول مرة في دراستنا.

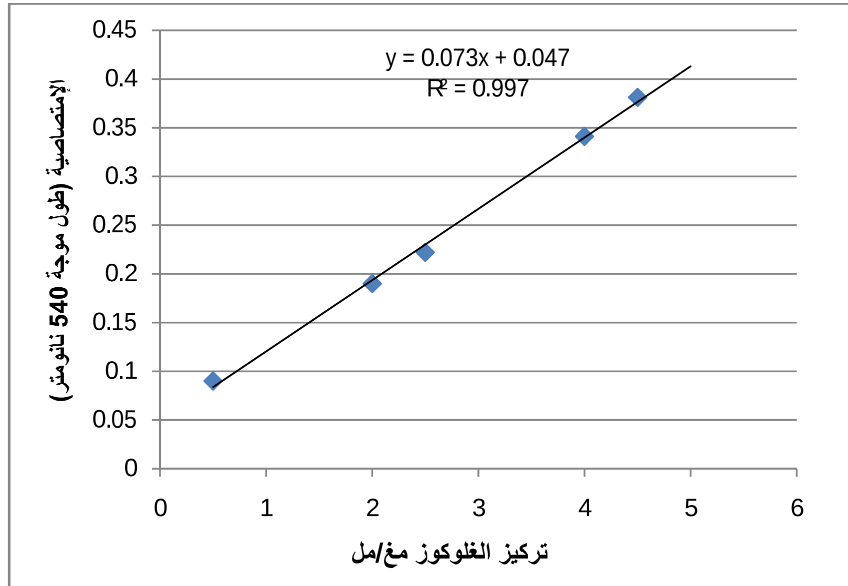
3-4 - إنتاج غلوكوز أوكسيداز وقياس فعاليته:

قيست الإمتصاصية لعدة تراكيز من الغلوكوز (0.5 - 1 - 1.5 – 2 – 2.5 – 3 -3.5 – 4 – 4.5 – 5) مغ/مل للحصول على المنحنى القياسي للفعالية الأنزيمية وذلك لمعرفة قيم الإمتصاص الضوئي للعينات على طول موجة 540 نانومتر وتم حساب الفعالية الأنزيمية وفق المعادلة التالية:

$$\mathbf{Y = 0.073X + 0.047}$$

$$\mathbf{R^2 = 0.997}$$

حيث X الفعالية الأنزيمية و Y الإمتصاصية كما هو موضح في الشكل (5):



الشكل(5) يبين المنحنى القياسي المستخدم لقياس فعالية غلوكوز أوكسيداز

4- 4- أمثلة ظروف إنتاج غلوكوز أوكسيداز باستخدام التصميم الإحصائي (RSM):

4-4-1-تصميم التجربة:

استخدم التصميم الإحصائي المذكور في الفقرة (3-2-7-1) في الجدول (4) لأمثلة ظروف إنتاج الأنزيم والذي يتألف من 54 معاملة و5 متغيرات, وتم الحصول على قيم الفعالية الأنزيمية لكل معاملة كما هو موضح في الجدول (7):

الجدول (7) يبين الفعالية الأنزيمية في المعاملات المدروسة

الغلوكوز	سرعة التهوية	مدة التحضين	درجة الحموضة	درجة الحرارة	الفعالية الأنزيمية U/mL
4	150	1	4	20	89
4	150	1	8	40	3
4	150	5	4	40	0
4	150	5	8	20	417
4	350	1	4	40	5
4	350	1	8	20	116
4	350	5	4	20	445
4	350	5	8	40	9
12	150	1	4	40	0
12	150	1	8	20	20
12	150	5	4	20	184
12	150	5	8	40	0
12	350	1	4	20	75
12	350	1	8	40	8
12	350	5	4	40	7
12	350	5	8	20	226
8	250	3	6	30	719
8	250	3	6	30	760
8	250	3	6	30	746
8	250	3	6	30	732
4	150	1	4	40	3
4	150	1	8	20	89
4	150	5	4	20	308
4	150	5	8	40	0
4	350	1	4	20	102
4	350	1	8	40	0
4	350	5	4	40	5
4	350	5	8	20	513
12	150	1	4	20	34
12	150	1	8	40	13
12	150	5	4	40	0
12	150	5	8	20	130
12	350	1	4	40	0
12	350	1	8	20	47
12	350	5	4	20	212
12	350	5	8	40	7
8	250	3	6	30	828
8	250	3	6	30	773
8	250	3	6	30	801

الغلوكوز	سرعة التهوية	مدة التحضين	درجة الحموضة	درجة الحرارة	الفعالية الأنزيمية U/mL
8	250	3	6	30	787
8	250	3	6	20	636
8	250	3	6	40	0
8	250	3	4	30	595
8	250	3	8	30	719
8	250	1	6	30	157
8	250	5	6	30	664
8	150	3	6	30	486
8	350	3	6	30	883
4	250	3	6	30	404
12	250	3	6	30	253
8	250	3	6	30	842
8	250	3	6	30	691
8	250	3	6	30	751
8	250	3	6	30	746

4-2-4-تحليل التجربة :

يبين الجدول (8) تأثير العوامل المدروسة (كل عامل على حدة, ومربع العوامل, والعلاقة بين العوامل) في فعالية الأنزيم كمايلي:

1 - Linear effect وتعني تأثير كل عامل لوحده في فعالية الأنزيم:

تحتوي المعادلة على 5 متغيرات (درجة الحرارة – pH – مدة التحضين – سرعة التهوية – نسبة الغلوكوز), نلاحظ من الجدول أن قيمة P لكل من درجة الحرارة ومدة التحضين ونسبة الغلوكوز أقل من 0.05 ($P<0.05$) وبالتالي هناك تأثير خطي معنوي لكل من هذه المتغيرات الثلاثة في فعالية الأنزيم, ومن جهة أخرى نلاحظ أن قيمة P لكل من pH وسرعة التهوية أكبر من 0.05 ($P>0.05$) وهذا يعني أنه ليس لهذين المتغيرين أي تأثير معنوي في فعالية الأنزيم وبالتالي لاتتغير فعالية الأنزيم بتغير هذين المتغيرين.

2 - Squares effect وتعني تأثير العوامل مربعة في فعالية الأنزيم:

تحتوي المعادلة على 5 متغيرات مربعة (Temperature*Temperature, pH*pH, Incubation time *Incubation time, Aeration speed*Aeration speed, Glucose*Glucose) ونلاحظ من الجدول أن قيمة P لكل من $Temperature^2$, $IncubationTime^2$, $Glucose^2$ كانت أقل من 0.05 ($P<0.05$) وهذا يعني أن هناك تأثير معنوي لهذه العوامل الثلاثة في فعالية الأنزيم, و العلاقة بين العوامل المربعة الثلاثة وفعالية الأنزيم على شكل منحني (قطع مكافئ).

3 - Interraction effect وتعني تأثير العوامل المترابطة (المتداخلة) في فعالية الأنزيم:

تحتوي المعادلة على 10 علاقات تداخل بين المتغيرات الخمسة وهي

(Temperature*pH, Temperature*Incubation time,

Temperature*Aeration speed, Temperature*Glucose,

pH*Incubation tim , pH*Aeration speed, pH*Glucose ,

Incubation time*Glucose, Incubation time*Aeration speed,

Aeration speed*Glucose).

نلاحظ من الجدول (8) أن علاقة درجة الحرارة كانت معنوية مع كل من مدة التحضين ونسبة الغلوكوز ($P<0.05$) بينما كانت العلاقات الأخرى غير معنوية .

معامل التحديد R^2 = 93.8 % وهذا يدل على أن معادلة الإنحدار للعوامل المتغيرة تؤثربنسبة 93.8 % على مقدار التغير في فعالية الأنزيم.

واعتماداً على الجدول (8) يمكن كتابة المعادلة كما يلي :

$$Y = -2489.71 + 165.14 X_1 - 141.1 X_2 + 395.41 X_3 - 2.86 X_4 + 248.8 X_5 - 2.82 X_1^2 + 13.3 X_2^2 - 44.89 X_3^2 + 0.01 X_4^2 - 16.77 X_5^2 - 0.28 X_1X_2 - 2.91X_1X_3 - 0.01 X_1X_4 + 0.91 X_1X_5 + 1.71 X_2X_3 - 0.01 X_2X_4 - 1.12 X_2X_5 + 0.03 X_3X_4 - 2.89 X_3X_5 - 0.01 X_4X_5$$

الجدول (8) يبين تأثير العوامل المدروسة في فعالية الأنزيم إحصائياً

Term	Coef	SE Coef	T	*P*
Constant	-2489.71	398.146	-6.253	0.00
Temperature	165.14	27.157	6.081	0.00
pH	-141.1	135.786	-1.039	0.30
Incubation time	395.41	74.172	5.331	0.00
Aeration speed	-2.86	2.295	-1.248	0.21
Glucose	248.8	47.051	5.288	0.00
Temperature*Temperature	-2.82	0.442	-6.381	0.00
pH*pH	13.36	11.052	1.209	0.23
Incubation time *Incubation time	-44.89	11.052	-4.062	0.00
Aeration speed*Aeration speed	0.01	0.004	1.593	0.11
Glucose*Glucose	-16.77	2.763	-6.07	0.00
Temperature*pH	-0.28	0.615	-0.453	0.65
Temperature*Incubation time	-2.91	0.615	-4.732	0.00
Temperature*Aeration speed	-0.01	0.012	-1.081	0.28
Temperature*Glucose	0.91	0.308	2.958	0.00
pH*Incubation time	1.71	3.075	0.558	0.57
pH*Aeration speed	-0.01	0.062	-0.171	0.86
pH*Glucose	-1.12	1.538	-0.73	0.46
Incubation time*Aeration speed	0.03	0.062	0.56	0.57
Incubation time*Glucose	-2.89	1.538	-1.879	0.06
Aeration speed*Glucose	-0.01	0.031	-0.245	0.80

يبين الجدول (9) وجود متغير واحد (Linear) على الأقل من المتغيرات المفردة الخمسة معنوي لأن $(P < 0.05)$, كما يوجد متغير مربع واحد (Square) على الأقل من المتغيرات المربعة الخمسة معنوي $(P < 0.05)$, ويوجد علاقة ترابط واحدة (Interraction) على الأقل من علاقات الترابط العشرة معنوية حيث $(P < 0.05)$.

Lack-of-Fit: تبين التغيرات الناتجة عن عدم صحة المعادلة ونلاحظ من الجدول أن $(P<0.05)$ وبالتالي فهي معنوية التأثير وهذا دليل على أن المعادلة تشرح بشكل جيد التغير في قيمة فعالية الأنزيم.

الجدول (9) يبين تحليل التباين

Source	**DF**	**Seq SS**	**Adj SS**	**Adj MS**	**F**	***P***
Regression	19	10134464	10134464	506723	52.33	0.00
Linear	4	1224046	2340341	468068	48.34	0.00
Square	4	8549289	8549289	1709858	176.57	0.00
Interaction	9	361129	361129	36113	3.73	0.00
Residual Error	87	842475	842475	9684		
Lack-of-Fit	22	804565	804565	36571	62.7	0.00
Pure Error	65	37910	37910	583		
Total	107	10976939				

4 -4 -3 - أمثلة ظروف إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز:

4- 4 -3- 1- تأثير درجة الحرارة في فعالية الأنزيم:

تشير النتائج المبينة في الشكل (6) إلى ازدياد الفعالية الأنزيمية بازدياد درجة الحرارة حتى ˚30 م والتي مثلت الدرجة الحرارية المثلى للإنتاج وإن ارتفاع درجة حرارة التحضين بعد ذلك عن ˚30 م قد رافقها انخفاض تدريجي في الفعالية الأنزيمية, وهذا يعكس ماذكره (السواح, 2002) بأن درجة الحرارة تؤثر بشكل مباشر في معدلات كل من النمو الميكروبي والتخليق الأنزيمي إذ أن الإنخفاض عن الحد الأمثل لدرجة حرارة الإنتاج يؤدي إلى تباطؤ النمو وتأخير تخليق الأنزيم المطلوب وأن ارتفاعها عن حدها الأمثل لتخليق الأنزيم قد يؤثر سلباً في الإنتاج وبالتالي في فعالية الأنزيم المنتج.

توافقت درجة الحرارة المثلى لإنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من فطر *P. citrinum* المتحصل عليها في هذه الدراسة مع ما توصل إليه (Sabir *et al*., 2007) في الباكستان والذين استخدموا فطر *P. notatum* في إنتاج الأنزيم حيث اختبروا تأثير درجات حرارية مختلفة تراوحت ما بين˚ 25 م و ˚40 م وكانت الدرجة ˚30 م أفضلها تأثيراً في إنتاج الأنزيم, والدرجة ذاتها كانت أفضل الدرجات الحرارية المدروسة لإنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من فطر *P. fellutamus* المعزول من تربة حاوية عقداً آزوتية في دراسة أجريت في الهند حيث استخدم في هذه الدراسة ثلاث درجات حرارية وهي ˚20 م و˚30 م و˚40 م وكانت الدرجة ˚30 م هي المثلى أيضاً (Manivannan and Kathiresan , 2007).

اختلفت درجة الحرارة المثلى المتحصل عليها في هذه الدراسة مع درجة الحرارة المثلى التي توصل إليها (El-sherbeny *et al*., 2005) حيث حصلوا على أقصى فعالية أنزيمية عند درجة حرارة˚37 م وباستخدام فطر *Aspergillus niger* المعزول من تربة مصرية حاوية على مخلفات من قصب السكر, وكذلك اختلفت درجة الحرارة المثلى في هذه الدراسة مع درجة الحرارة المثلى التي توصل إليها (Anjum Zia *et al*., 2007) الذين حصلوا على أقصى فعالية أنزيمية عند الدرجة ˚40 م باستخدام فطر *Aspergillus niger* BCG-5, ويعزى التباين في النتائج إلى استخدام الباحثين عزلات فطرية محبة لدرجات الحرارة العالية (Thermophiles) في دراستهم.

4- 4 -3- 2- تأثير درجة الحموضة في فعالية الأنزيم:

تتميز الأنزيمات بحساسية عالية للتغير في قيمة pH الوسط, إضافة إلى أن تعيين pH الأمثل لإنتاج الأنزيم تعد خطوة هامة في عملية الإنتاج, ويفسر تأثير درجة الحموضة في إنتاج الأنزيم من ناحيتين, الأولى هو تأثيره في صفات الوسط كقابلية ذوبان المواد المغذية وتأينها وجاهزيتها للإنتقال إلى داخل الخلايا, أما الناحية الثانية هي تأثير قيمة pH على ثبات الأنزيمات المنتجة, وبالتالي فإن انخفاض الفعالية الأنزيمية مع انخفاض أو زيادة pH الوسط يعود إلى تأثيره في نمو الكائن الحي الدقيق من جهة وثبات الأنزيم من جهة أخرى (عمران, 2006).

تحققت أعلى فعالية لأنزيم غلوكوز أوكسيداز المنتج من فطر *P. citrinum* في الدراسة الحالية عند درجة حموضة (pH) تساوي 6 علماً ان تأثير درجة الحموضة (pH) كان غير معنوياً (P>0.05) كماهو موضح في الشكل (6) وهذا يتوافق مع ما توصل إليه (Ragini *et al*., 2010) الذين استخدموا فطر *P. chrysogenum* المعزول من الجبن في إنتاج الأنزيم ضمن مدى pH تراوح ما بين 4 إلى 8 فكانت درجة الحموضة المثلى هي 6, بينما كانت الدرجة 6.5 هي المثلى في إنتاج الأنزيم من فطر *P. fellutamus* (Manivannan and Kathiresan, 2007), وهذه النتيجة تقارب النتيجة التي حصلنا عليها في دراستنا. كما وحصل (Anjum Zia *et al*., 2007) على أقصى فعالية أنزيمية عند درجة حموضة تعادل 5.5 باستخدام الفطر *Aspergillus niger* UAF-1 وهذه النتيجة تقارب أيضاً النتيجة المتحصل عليها في دراستنا, في حين اختلفت درجة الحموضة المثالية لإنتاج الأنزيم في هذه الدراسة مع ماتوصل إليه (Hamid *et al*., 2003) بأن درجة الحموضة المثلى لإنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من فطر *Aspergillus niger* هي 4.

أفاد (أحمد والنواوي, 1999) في هذا السياق بأن معظم الفطريات تنمو عند أس هيدروجيني (pH) يتراوح ما بين 4 و7 إذ أن البيئة المائلة للحموضة تناسب إنبات الأبواغ بصورة عامة. كما أن أفضل إنتاج لمعظم الأنزيمات الخارجية تكون عند أرقام pH المثلى للنمو إلا أن بعضها يشذ عن ذلك فليس من الضروري أن يتطابق pH الأمثل للنمو مع pH الأمثل للفعالية الأنزيمية فهنالك ثلاث قيم pH إحداها للنمو الميكروبي, وأخرى للتخليق الخلوي للأنزيم, وثالثة لثبات الأنزيم (Volesky and laung, 1985).

4-3-3-3- تأثير فترة الحضانة في فعالية الأنزيم :

رافق تحضين الفطر المنتج للأنزيم *P. citrinum* لمدة 3 أيام في هذه الدراسة الحصول على أقصى فعالية أنزيمية كماهو موضح في الشكل (6) تلا ذلك انخفاض في الفعالية الأنزيمية بزيادة فترة التخمير, ويعزى هذا الإنخفاض إلى زيادة تركيز بعض المواد الوسطية الناتجة عن تمثيل المواد الغذائية الموجودة في الوسط المغذي والتي تؤثر بصورة سلبية في إنتاج الأنزيم, أو قد تؤدي زيادة مدة الحضانة إلى تراكم بعض الأنزيمات مثل أنزيمات البروتياز التي تؤثر في فعالية الأنزيمات الأخرى (عمر, 2006).

توافقت نتيجتنا مع توصل إليه (Sabir *et al*., 2007) من فعالية أنزيمية قصوى رافقت استخدامهم فترة مدتها 3 أيام من التخمير لوسط إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من فطر *P. notatum*, وفي دراسة أخرى أجراها (Ragini *et al*., 2010) على فطر *P. chrysogenum* المعزول من الجبن قدرت فعالية الأنزيم بعد كل 24 ساعة من التحضين ولمدة 120 ساعة فكانت النتيجة أن أعلى فعالية أنزيمية تم الحصول عليها عند التحضين لمدة 72 ساعة على درجة حرارة 30° م, وانخفضت الفعالية الأنزيمية عند التحضين لمدة أطول من 72 ساعة لتبلغ أدناها عند التحضين لمدة 120 ساعة, كما توصل (Manivannan and Kathiresan, 2007) إلى أقصى فعالية لأنزيم غلوكوز أوكسيداز المنتج من فطر *P. fellutamus* عند فترة تخمير لوسط الإنتاج بلغت 3 أيام, وهذا يعكس التقارب النسبي لنتائج الباحثين في الدراسات المذكورة مع ماخلصت إليه نتائج هذه الدراسة.

خالفت نتيجتنا بالمقابل ما توصل إليه (Hamid *et al*., 2003) الذين حصلوا على أقصى فعالية للأنزيم المنتج من فطر *Aspergillus niger* عنذ التحضين لمدة 36 ساعة, بينما انخفضت الفعالية الأنزيمية عند التحضين لفترة زمنية أطول من ذلك, كما اختلفت فترة الحضانة المثالية لإنتاج الأنزيم في هذه الدراسة مع ما توصل إليه (Bankar *et al*., 2009) الذين تحصلوا على أقصى فعالية لأنزيم غلوكوز أوكسيداز من فطر *Aspergillus niger* عند 96 ساعة من التحضين, وقد يعزى هذا التباين إلى استخدام الباحثين أجناس وأنواع فطرية مختلفة أو حجم لقاح مختلف أو درجات حرارة مختلفة وهذا كله من شأنه أن يؤثر في فترة وصول الفطر إلى الإنتاج المثالي.

4 -4 -3 -4- تأثير نسبة الغلوكوز في فعالية الأنزيم :

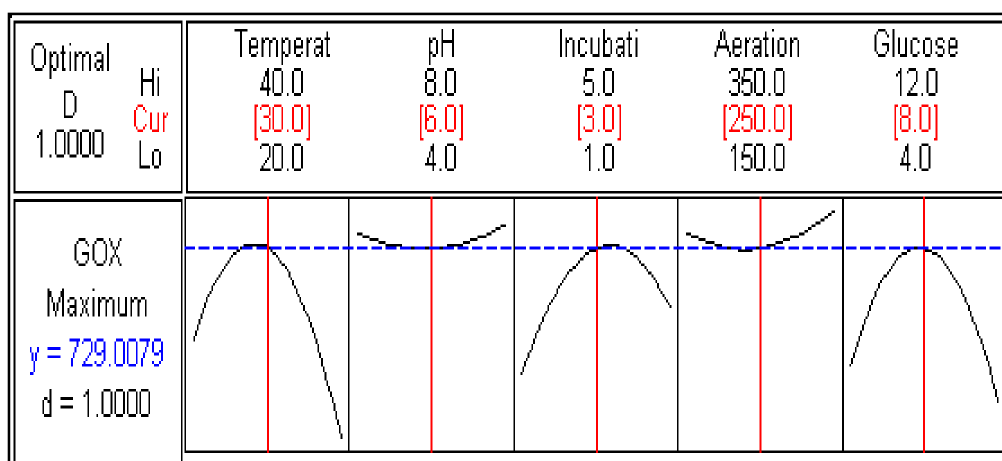
استخدمت تراكيز مختلفة من الغلوكوز في الوسط المستخدم لتنمية الفطر المنتج لغلوكوز أوكسيداز *P. citrinum* وتم قياس الفعالية الأنزيمية من أجل تحديد تركيز الغلوكوز المثالي لإنتاج الأنزيم, فكانت النسبة 8% هي المثلى كماهو موضح في الشكل (6), وهذا يتوافق مع ماتوصل إليه (Petruccioili *et al*., 1997) عند اختبارهم فعالية 10 مصادر كربونية مختلفة على إنتاج غلوكوز أوكسيداز من فطر (M-80-10) *P. variabile* فأعطى استخدام الغلوكوز أعلى مستوى من غلوكوز أوكسيداز وكانت النسبة المثلى لاستخدامه هي 8%, وكذلك توافقت نتيجتنا مع (Rogalski *et al*., 1988) الذين استخدموا الغلوكوز كركيزة أساسية لإنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من السلالة الفطرية *Aspergillius niger* G-13 حيث تبين باختبارهم نسب مختلفة من الغلوكوز في وسط إنتاج الأنزيم أن النسبة 8% هي المثالية لإنتاج الأنزيم بأعلى فعالية وانخفضت فعالية الأنزيم بزيادة تركيز الغلوكوز عن هذه النسبة, وفي دراسة أخرى أجراها (Simpson., 2006) على إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من فطر *P. canescens* أعطى الأنزيم أعلى فعالية بعد 3 أيام من التحضين على درجة حرارة 28˚ م وباستخدام الغلوكوز بنسبة 8%.

خالفت نتيجتنا بالمقابل دراسة حديثة أجراها (Khurshid *et al*., 2011) في الباكستان على أمثلة ظروف إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز المنتج من فطر *Aspergillius niger* المعزول من البطاطا, حيث استخدموا في هذه الدراسة الغلوكوز كركيزة أساسية للأنزيم واختبروا تأثير تراكيز مختلفة للغلوكوز تراوحت ما بين 3% إلى 13% على إنتاج الأنزيم الذي أعطى أعلى فعالية باستخدام 10% من الغلوكوز, وبذلك توافقت نتيجتهم مع (Markwell *et al*., 1989) بأن النسبة المثلى للغلوكوز المستخدم لإنتاج الأنزيم من فطر *Aspergillius niger* كانت 10% أيضاً. بينما استخدم المولاس كركيزة لإنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من فطر *Aspergillius niger* في دراسة أخرى لـ (Hatzinikolaou and Macris, 1995) بعد أن تفوق على المصادر الكربونية الأخرى التي تم اختبارها في هذه الدراسة بما فيها الغلوكوز وأعطى الأنزيم أعلى فعالية باستخدام 3% من المولاس.

4 -4 -3 -5- تأثير سرعة التهوية في فعالية الأنزيم :

طبقت سرعات تهوية مختلفة على الوسط المستخدم لتنمية الفطر المنتج لأنزيم غلوكوز أوكسيداز *P. citrinum* وتم قياس الفعالية الأنزيمية من أجل تحديد السرعة المثلى لإنتاج الأنزيم فكانت السرعة 250 دورة/دقيقة هي المثلى علماً أن تأثير سرعة التهوية في دراستنا لم يكن معنوياً في فعالية الأنزيم (P>0.05) كماهو موضح في الشكل (6), وقد توافقت نتيجتنا تقريباً مع دراسة أجراها (Jafari *et al*., 2007) في إيران على تأثير سرعة التهوية والتحريك في إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من فطر *Aspergillius niger* حيث استخدموا في دراستهم سرعات تحريك لوسط الإنتاج تراوحت من 150 دورة/دقيقة إلى 400 دورة/دقيقة , فلوحظ ازدياد الفعالية الأنزيمية بشكل ملحوظ بزيادة سرعة التهوية من 150 دورة/دقيقة إلى 300 دورة/ دقيقة, لتعود بعد ذلك الفعالية بالانخفاض بزيادة سرعة التهوية, وكان تأثير سرعة التهوية في إنتاج الأنزيم أكثر معنوية من تأثيره في نمو خلايا فطر *Aspergillius niger* , بينما كانت السرعة 400 دورة /دقيقة هي المثلى في دراسة أخرى أجراها (Petrucoili *et al*., 1995) والتي درسوا فيها تأثير سرعات تحريك مختلفة لوسط إنتاج الأنزيم من فطر *P. variabile* تراوحت من 300 دورة/دقيقة إلى 900 دورة/ دقيقة.

خالفت نتيجتنا بالمقابل ماتوصل إليه (Bankar *et al*., 2009) الذين اختبروا تأثير سرعتي تهوية في فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز المنتج من فطر *Aspergillius niger* وهي 460 دورة/دقيقة و700 دورة/دقيقة حيث أعطى الفطر أعلى فعالية أنزيمية عند سرعة تحريك 700 دورة/دقيقة.

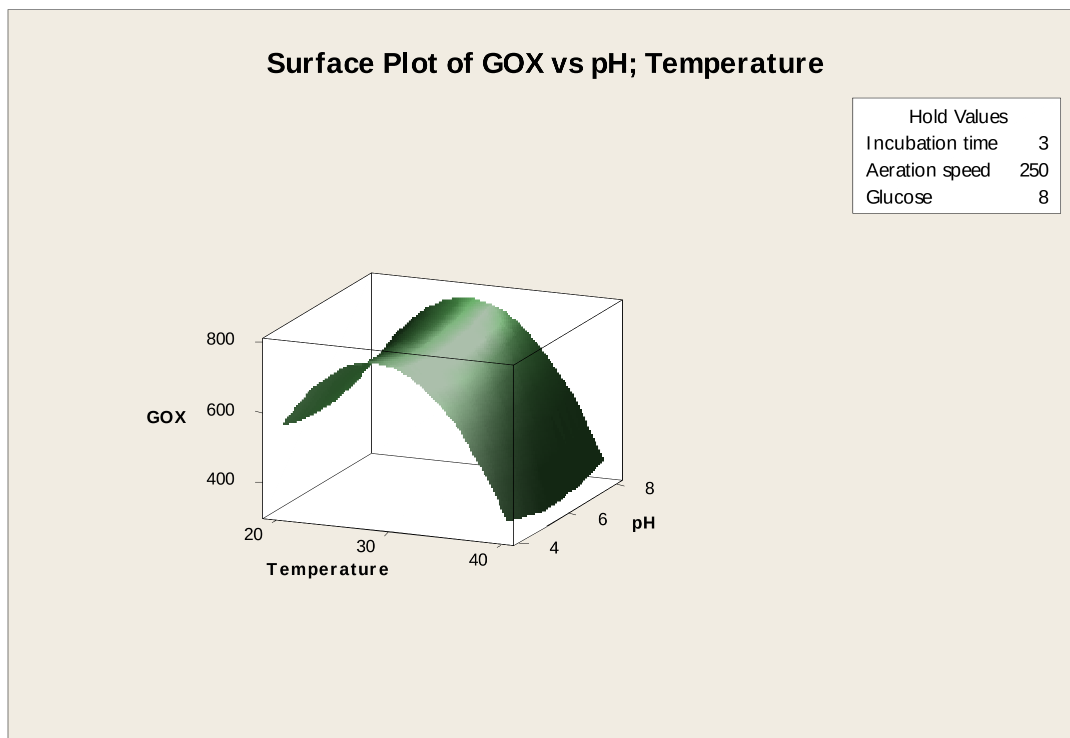


الشكل (6) يبين الظروف المثلى لإنتاج غلوكوز أوكسيداز

نلاحظ من الشكل (6) أن العلاقة بين كل من (درجة الحرارة ومدة التحضين ونسبة الغلوكوز) وفعالية الأنزيم كانت على شكل منحني (قطع مكافئ) لأن تأثيرها معنوي في فعالية الأنزيم, بينما لم تتخذ العلاقة بين درجة الحموضة (pH) وفعالية الأنزيم ولا العلاقة بين سرعة التهوية وفعالية الأنزيم شكل قطع مكافئ لأن تأثيرهما غير معنوي في فعالية الأنزيم حسب التحليل الإحصائي المتبع في دراستنا.

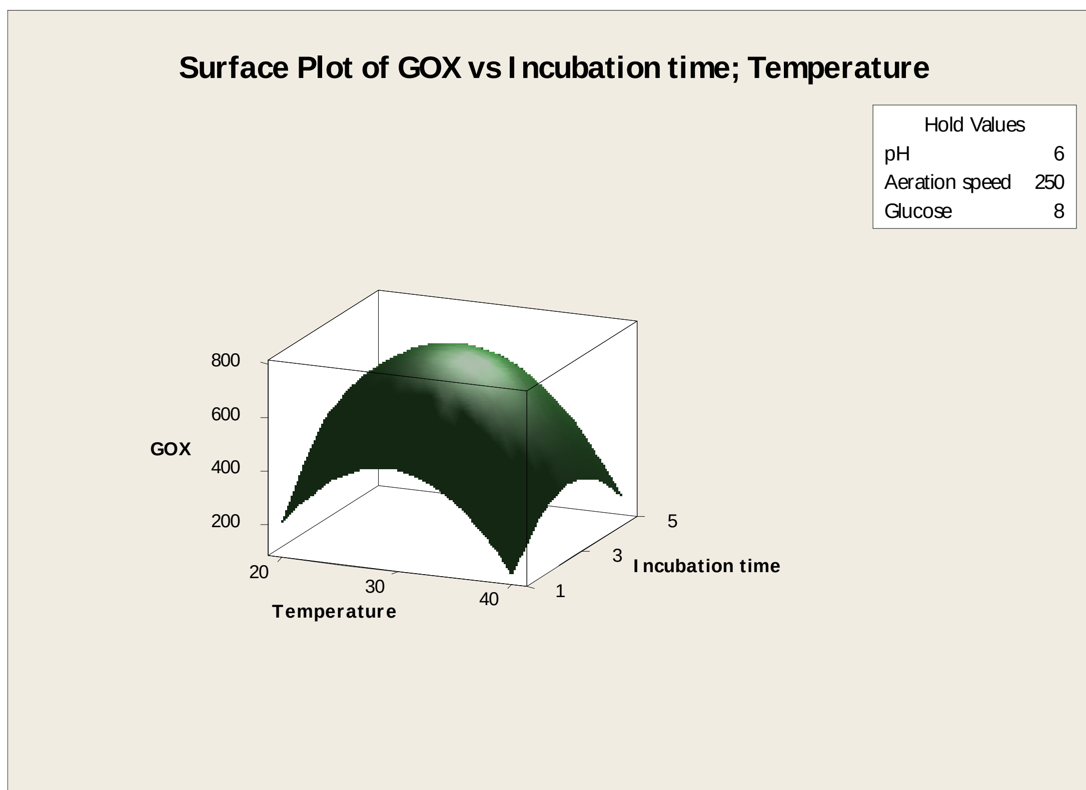
4-4-4 - تأثير كل متغيرين معاً في فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز:

يبين الشكل (7) تأثير اثنين من المتغيرات (pH ودرجة الحرارة) في فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز مع تثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن الفعالية الأنزيمية لا تتأثر كثيراً بارتفاع درجة الحموضة pH نظراً لأن تأثيرها غير معنوي في فعالية الأنزيم بينما ترتفع الفعالية الأنزيمية ارتفاعاً ملحوظاً بازدياد درجة الحرارة لتصل إلى أقصى قيمة لها عند 30° م ثم تعود الفعالية الأنزيمية للإنخفاض بعد ذلك لتصل إلى أدنى قيمة لها عند 40° م وكانت العلاقة مابين درجة الحرارة ودرجة الحموضة غير معنوية في فعالية الأنزيم.



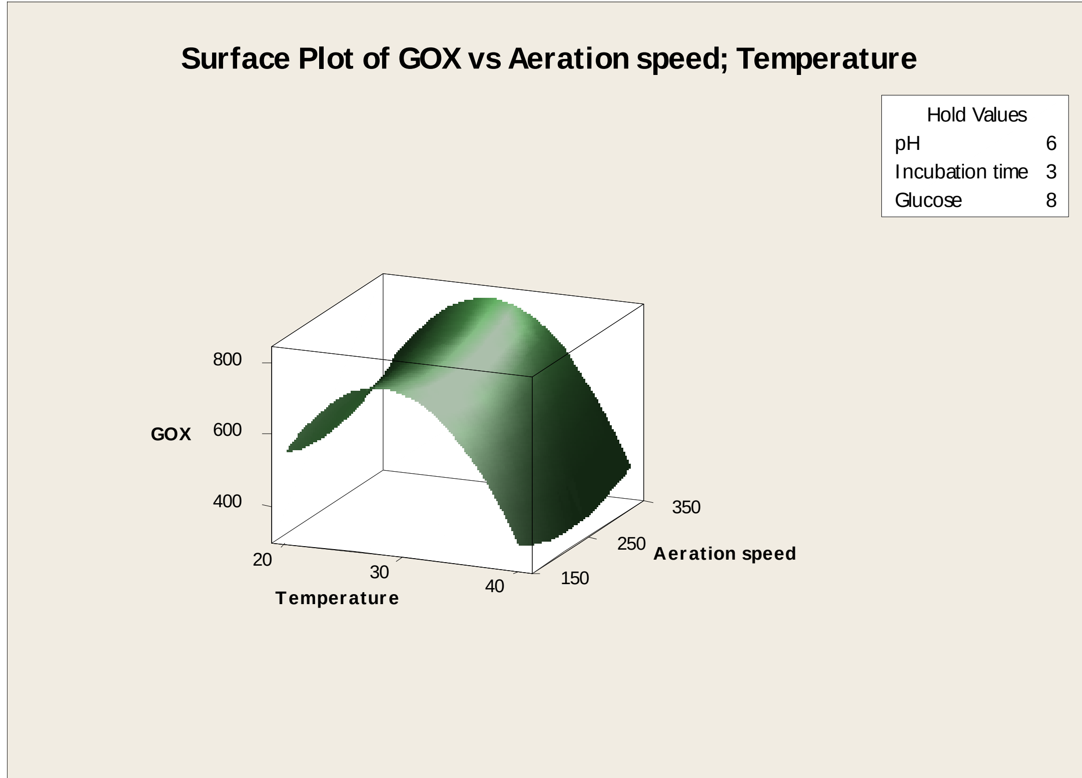
الشكل (7) يبين تأثير pH ودرجة الحرارة في فعالية غلوكوز أوكسيداز

يبين الشكل (8) تأثير اثنين من المتغيرات (درجة الحرارة ومدة التحضين) في فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز مع ثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن الفعالية الأنزيمية تزداد تدريجياً بازدياد مدة التحضين لتصل إلى أقصى قيمة لها عند التحضين لمدة 3 أيام ثم تعود الفعالية الأنزيمية للإنخفاض بعد ذلك لتصل إلى أدنى قيمة لها عند التحضين لمدة 5 أيام, كما وتزداد الفعالية الأنزيمية بازدياد درجة الحرارة لتصل إلى أقصى قيمة لها عند 30° م, ثم تعود الفعالية الأنزيمية للإنخفاض بعد ذلك لتصل إلى أدنى قيمة لها عند 40° م وكانت العلاقة مابين درجة الحرارة ومدة التحضين معنوية في فعالية الأنزيم.



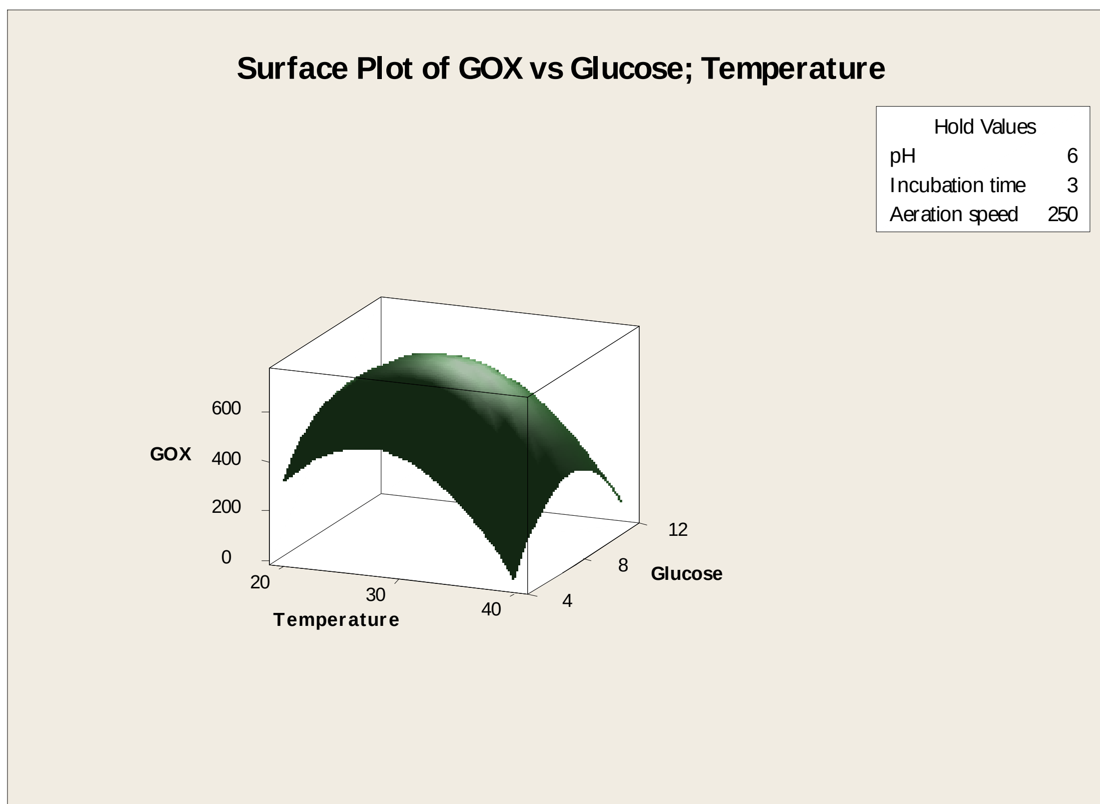
الشكل (8) يبين تأثير درجة الحرارة ومدة التحضين في فعالية غلوكوز أوكسيداز

يبين الشكل (9) تأثير اثنين من المتغيرات (درجة الحرارة وسرعة التهوية) في فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز مع ثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن الفعالية الأنزيمية لم تتأثر كثيراً بازدياد سرعة التهوية نظراً لأن تأثيرها غير معنوي في فعالية الأنزيم, بينما ترتفع الفعالية الأنزيمية ارتفاعاً ملحوظاً بازدياد درجة الحرارة لتصل إلى أقصى قيمة لها عند °30 م ثم تعود الفعالية الأنزيمية للإنخفاض بعد ذلك لتصل إلى أدنى قيمة لهاعند °40 م وكانت العلاقة مابين درجة الحرارة وسرعة التهوية غير معنوية في فعالية الأنزيم.



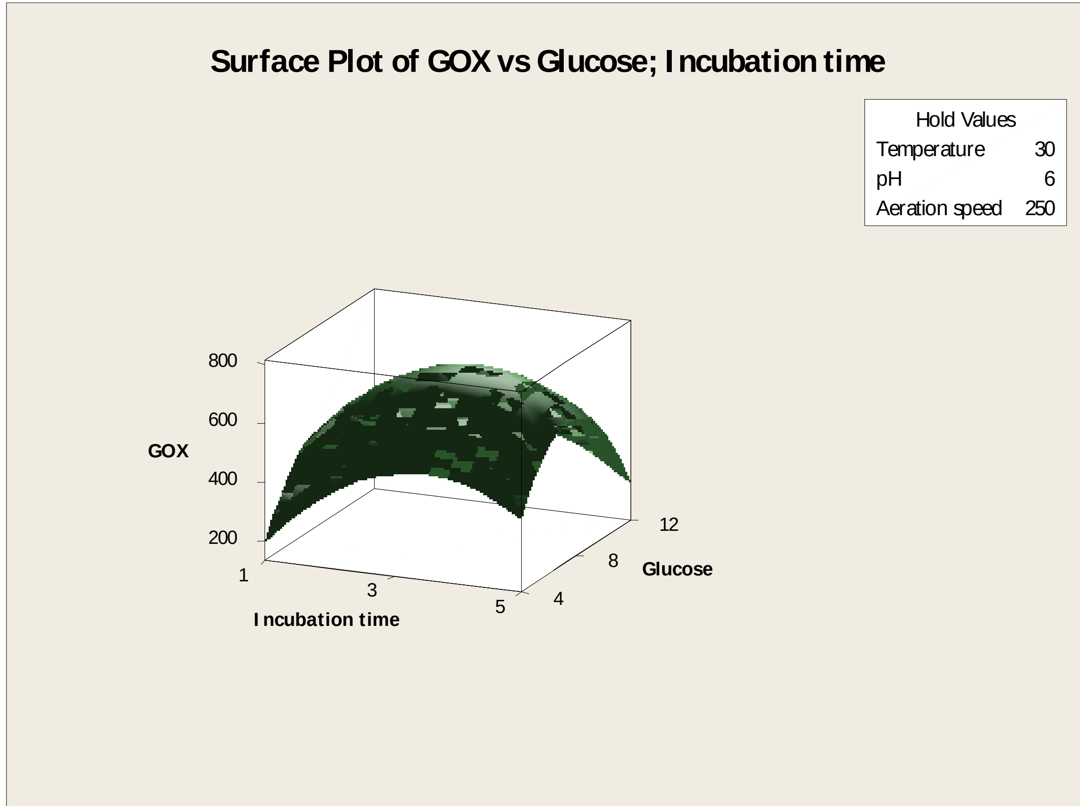
الشكل (9) يبين تأثير درجة الحرارة وسرعة التهوية في فعالية غلوكوز أوكسيداز

يبين الشكل (10) تأثير اثنين من المتغيرات (درجة الحرارة ونسبة الغلوكوز) في فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز مع ثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن الفعالية الأنزيمية ترتفع ارتفاعاً ملحوظاً بزيادة نسبة الغلوكوز لتصل إلى أقصى قيمة لها عند 8% ثم تعود بعد ذلك الفعالية الأنزيمية للإنخفاض مع زيادة نسبة الغلوكوز لتصل إلى أدنى قيمة لها عند تركيز 12%, كما وتزداد الفعالية الأنزيمية بازدياد درجة الحرارة لتصل إلى أقصى قيمة لها عند 30° م ثم تعود الفعالية الأنزيمية للإنخفاض بعد ذلك لتصل إلى أدنى قيمة لها عند 40° م وكانت العلاقة مابين درجة الحرارة ونسبة الغلوكوز معنوية في فعالية الأنزيم.



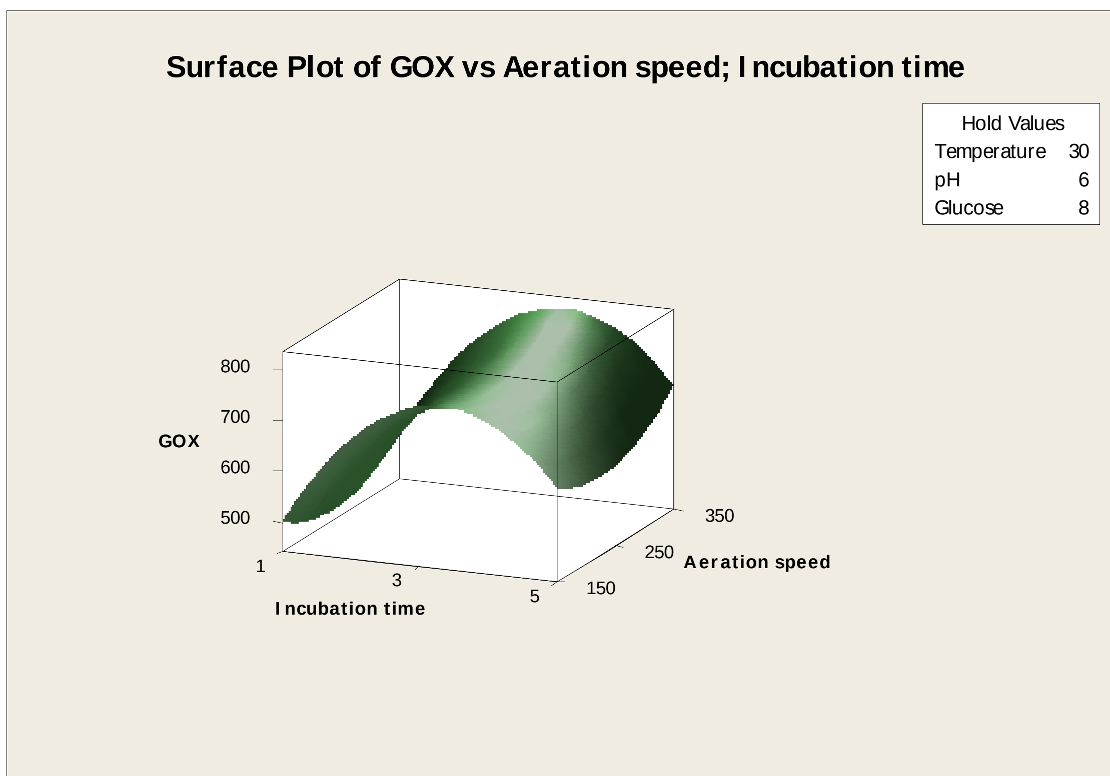
الشكل (10) يبين تأثير درجة الحرارة ونسبة الغلوكوز في فعالية غلوكوز أوكسيداز

يبين الشكل(11) تأثير اثنين من المتغيرات (مدة التحضين ونسبة الغلوكوز) في فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز مع ثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن الفعالية الأنزيمية ترتفع بارتفاع نسبة الغلوكوز لتصل إلى أقصى قيمة لها عند 8% ثم تعود بعد ذلك الفعالية الأنزيمية للإنخفاض مع زيادة نسبة الغلوكوز لتصل إلى أدنى قيمة لها عند تركيز 12%, كما وتزداد الفعالية الأنزيمية بازدياد مدة التحضين لتصل إلى أقصى قيمة لها عند 3 أيام ثم تعود الفعالية الأنزيمية للإنخفاض بعد ذلك لتصل إلى أدنى قيمة لها عند التحضين لمدة 5 أيام, والعلاقة بين نسبة الغلوكوز ومدة التحضين غير معنوية في فعالية الأنزيم.



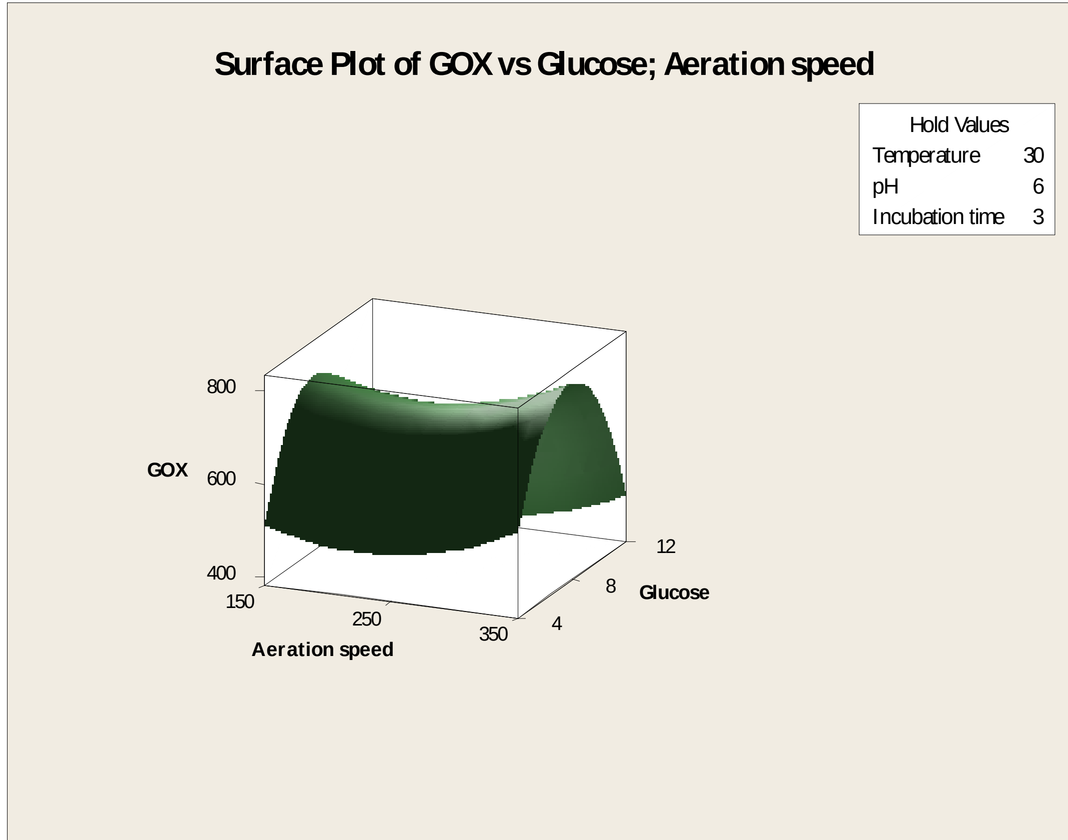
الشكل (11) يبين تأثير مدة التحضين ونسبة الغلوكوز في فعالية غلوكوز أوكسيداز

يبين الشكل (12) تأثير اثنين من المتغيرات (مدة التحضين وسرعة التهوية) في فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز مع ثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن الفعالية الأنزيمية تزداد بازدياد مدة التحضين لتصل إلى أقصى قيمة لها عند 3 أيام ثم تعود الفعالية الأنزيمية للإنخفاض بعد ذلك لتصل إلى أدنى قيمة لها عند التحضين لمدة 5 أيام, بينما لم تتأثر الفعالية الأنزيمية كثيراً بازدياد سرعة التهوية نظراً لأن تأثيرها غير معنوي في فعالية الأنزيم, والعلاقة بين مدة التحضين وسرعة التهوية غير معنوية في فعالية الأنزيم.



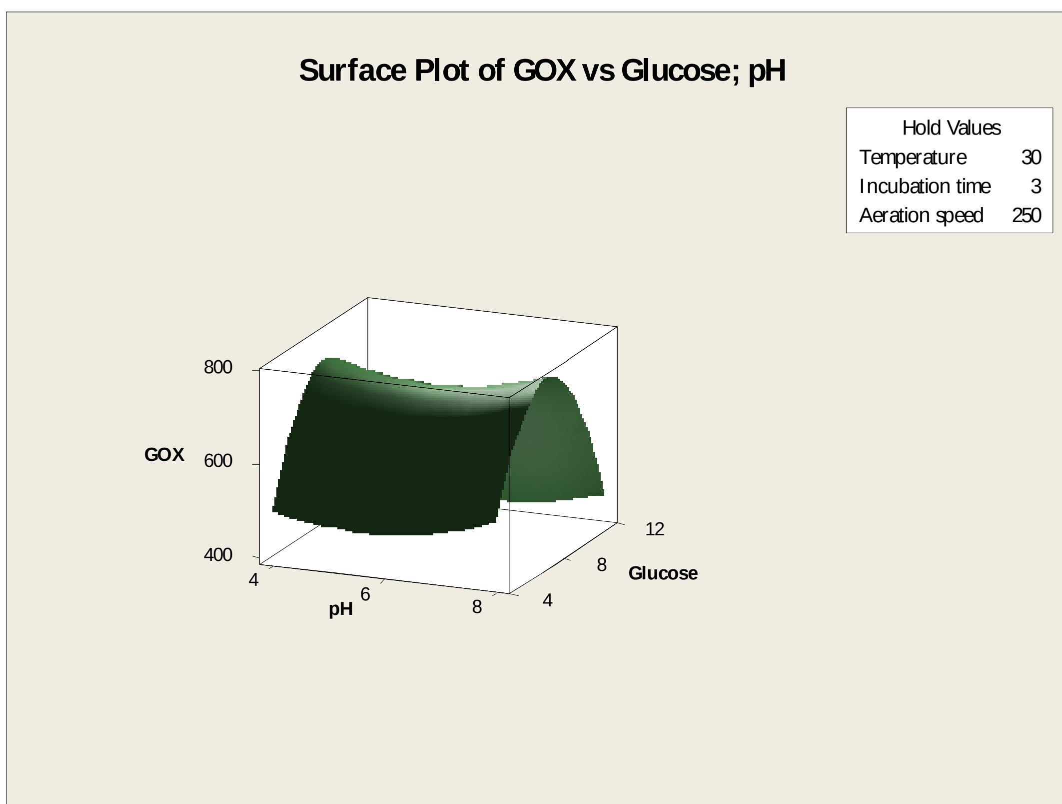
الشكل (12) يبين تأثير مدة التحضين وسرعة التهوية في فعالية غلوكوز أوكسيداز

يبين الشكل (13) تأثير اثنين من المتغيرات (نسبة الغلوكوز وسرعة التهوية) في فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز مع ثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن الفعالية الأنزيمية ترتفع بارتفاع نسبة الغلوكوز لتصل إلى أقصى قيمة لها عند 8% ثم تعود بعد ذلك الفعالية الأنزيمية للإنخفاض مع زيادة نسبة الغلوكوز لتصل إلى أدنى قيمة لها عند تركيز 12%, بينما لم تتأثر الفعالية الأنزيمية كثيراً بازدياد سرعة التهوية نظراً لأن تأثيرها غير معنوي في فعالية الأنزيم, والعلاقة بين نسبة الغلوكوز وسرعة التهوية غير معنوية في فعالية الأنزيم.



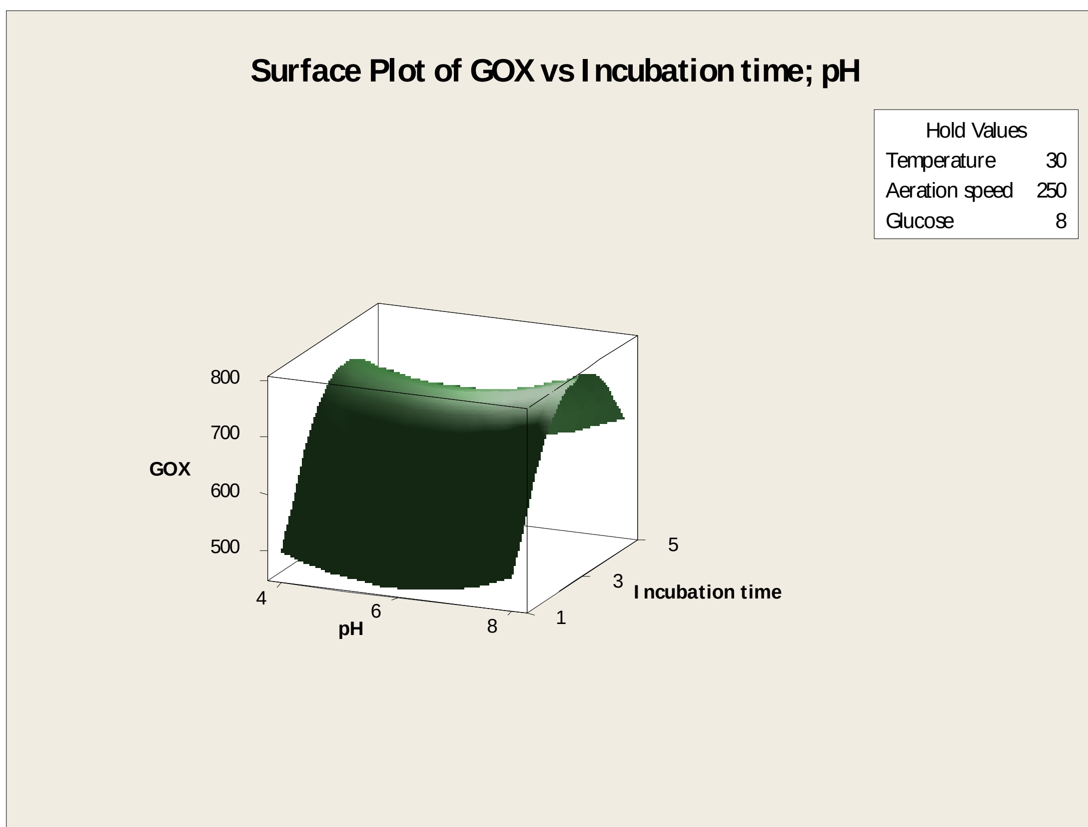
الشكل (13) يبين تأثير نسبة الغلوكوز وسرعة التهوية في فعالية غلوكوز أوكسيداز

يبين الشكل (14) تأثير اثنين من المتغيرات (نسبة الغلوكوز وpH) في فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز مع ثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن الفعالية الأنزيمية ترتفع بزيادة نسبة الغلوكوز لتصل إلى أقصى قيمة لها عند 8% ثم تعود بعد ذلك الفعالية الأنزيمية للإنخفاض مع زيادة نسبة الغلوكوز لتصل إلى أدنى قيمة لها عند تركيز 12%, بينما لم تتأثر الفعالية الأنزيمية كثيراً بارتفاع درجة الحموضة pH نظراً لأن تأثيرها غير معنوي في فعالية الأنزيم, والعلاقة بين نسبة الغلوكوز ودرجة الحموضة غير معنوية في فعالية الأنزيم.



الشكل (14) يبين تأثير نسبة الغلوكوز وpH في فعالية غلوكوز أوكسيداز

يبين الشكل (15) تأثير اثنين من المتغيرات (مدة التحضين وpH) في فعالية أنزيم غلوكوز أوكسيداز مع ثبيت العوامل الاخرى عند القيم المثلى, حيث يلاحظ من الشكل أن الفعالية الأنزيمية تزداد بازدياد مدة التحضين لتصل إلى أقصى قيمة لها عند 3 أيام ثم تعود الفعالية الأنزيمية للإنخفاض بعد ذلك لتصل إلى أدنى قيمة لها عند التحضين لمدة 5 أيام, بينما لم تتأثر الفعالية الأنزيمية كثيراً بارتفاع درجة الحموضة pH نظراً لأن تأثيرها غير معنوي في فعالية الأنزيم, والعلاقة بين مدة التحضين ودرجة الحموضة غير معنوية في فعالية الأنزيم.



الشكل (15) يبين تأثير مدة التحضين و pH في فعالية غلوكوز أوكسيداز

الإستنتاجات والتوصيات
Conclusion & Recommendations

5- الإستنتاجات :

1- قدرت نسبة أنواع فطور البنسليوم المنتجة لأنزيم غلوكوز أوكسيداز بـ 25% من الفطور المدروسة.

2- شخصت وصنفت العزلات الفطرية الخمسة المنتجة للأنزيم إلى Jm3(*P. citrinum*), Jm4(*Penicillium* spp.), Fr1 (*P. citrinum**), Be1 (*P. expansum*) و Ju1(*P. paraherquei*).

3- تميزت العزلة Jm3(*P. citrinum*) عن العزلات الأخرى بفعالية أنزيمية عالية حيث وصل متوسط قطر الهالة إلى 6.3±0.12 مم .

4- بينت نتائج أمثلة الظروف المثلى لإنتاج الأنزيم من فطر Jm3 (*P. citrinum*) أن هناك تأثيراً معنوياً لكل من درجة الحرارة ومدة التحضين ونسبة الكربوهيدرات في فعالية الأنزيم بينما لم تتأثر الفعالية الأنزيمية بشكل كبير بتغيرات درجة الحموضة وسرعة التهوية.

5- بينت النتائج أن علاقة درجة الحرارة كانت معنوية مع كل من مدة التحضين ونسبة الغلوكوز.

6- بينت نتائج أمثلة ظروف إنتاج الأنزيم بأن درجة الحرارة ودرجة الحموضة وسرعة التهوية ومدة التحضين ونسبة الغلوكوز المثلى كانت 30? م و pH=6 و250 دورة/دقيقة و3 أيام و8 % على التوالي.

6- التوصيات :

1- استخدام المخمر في إنتاج أنزيم غلوكوز أوكسيداز من العزلة المدروسة Jm3 وهي *P. citrinum* والتي أعطت أعلى فعالية أنزيمية, والتعاون والتنسيق بين المؤسسات العلمية والتقنية لتصنيع المخمرات الخاصة بإنتاج الأنزيمات على مستوى تجاري.

2- تنقية أنزيم غلوكوز أوكسيداز بغية استخدامه في بعض التطبيقات الغذائية والصيدلانية والحد من استيراده.

3- استخدام تقنيات وراثية كعملية التنسيل (Cloning) وهندسة البروتين لتطوير الإنتاج وزيادة كفاءة الأنزيم التطبيقية.

المراجع
References

المراجع العربية

- أحمد, محمد علي والنواوي, محمد عبد الرزاق (1999). الفطريات الصناعية. الدار العربية للتوزيع و النشر, الطبعة الأولى, 27 - 30.
- الخفاجي, زهرة (1990). التقنية الحيوية .دار الحكمة للطباعة و النشر, الموصل .
- الخياط, غسان حمادة (2005). الصناعات الميكروبيولوجية. كلية الزراعة. جامعة دمشق, الطبعة الثانية, 7 - 9.
- الخياط, غسان حمادة ومحمد, محمد (2000). كيمياء مكونات الأغذية. كلية الزراعة, جامعة دمشق.
- الرحمة, عبد الله بن ناصر (1998). أساسيات علم الفطريات. كلية العلوم, جامعة الملك سعود.
- السواح, محمود محمد عوض الله (2002). الأنزيمات الميكروبية. دار النيل للطباعة – الطبعة الأولى – مصر.
- العاني, فائز عزيز (1993) .التكنولوجيا الحيوية. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.
- عمار, محمد محمد (2002). الفطريات. الدار العربية للنشر والتوزيع. الطبعة الأولى.
- عمر, عادل (2006). إنتاج أنزيمات الأميلاز من الفطريات وتنقيتها واستعمالها في بعض المجالات التطبيقية. أطروحة دكتوراه في قسم علوم الأغذية, كلية الزراعة, جامعة دمشق, سوريا.
- عمران, عبد الملك محمد مسعد (2006). إنتاج أنزيم البروتياز القلوي من بكتريا *Bacillius* واستخدامه في بعض الصناعات الغذائية و الكيميائية. أطروحة دكتوراه في قسم علوم الأغذية, كلية الزراعة, جامعة دمشق, سوريا.
- فضول , جودة و نفاع , وليد (2009) . علم الفطريات. كلية الزراعة, جامعة دمشق ,241 - 244 .
- فودة, يحيى حسن, عبد الله, محمد أمين والشيمي, مجدي جمعة (1998). نظم الأنزيمات وتطبيقاتها في التصنيع الغذائي, الدار العربية للنشر والتوزيع, الطبعة الأولى, مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية.

المراجع الأجنبية

- Anastassiadis, S., Aivasidis, A. and Wandre, y C. (2003).Continuos gluconic acid production by isolated yeast-like mould strains of *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Microbial. Biotechnol*; **61**:110-117.

- Anjum Zia, M., Rahman, Kh. Saeed, M. and Anjum, F. (2007). Thermal characterization of hyperproduced glucose oxidase from *Aspergillus niger* BCG-5 mutant strain. *International Conference on complex medical engineering*; 1950-1955.

- Anjum Zia,M., Rahman,Kh., Saeed,M.,Andaleeb,F.,Rojoka,M., Sheikh,M.,Khan,I. and Khan, A. (2007) . Thermal characterization of Purified glucose oxidase from anewly Isolated *Aspergillus niger* UAF-1.*Clinical Biotechem;* **42**(2):132-138.

-BACAS (2004) Industrial biotechnology and sustainable chemistry. Royal Belgian Academy Council of Applied Science, Belgium.

- Bankar, S.B., Bule, M. V., Singhal, R. S. and Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase — An overview. *Food Engineering and Technology Department*; **27**(4):489-501.

- Bao, J., Furumoto, K., Yoshimoto, M., Fukunaga, K., Nakao, K. (2003).Competitive inhibition by hydrogen peroxide produced in glucose oxidation catalyzed by glucose oxidase. *Biochem Eng J* ; **13**:69–72.

- Bao, J., Furumoto, K., Fukunaga, K.and Nakao, K. (2001). A kinetic study on air oxidation of glucose catalyzed by immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate. *Biochem Eng J* **.8**:91–102.

-Beltrame, P.M., Comotti, C., Della Pina, and Rossi, M.(2004). Aerobic oxidation of glucose I. Enzymatic catalysis. *J. Catalysis*. **228**:282-287.

- Betancol, L., L?pez-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Guis?n, J.M. and Fern?ndez-Lafuente, R. (2006). Preparation of a very stable immobilized biocatalyst of

glucose oxidase from *Aspergillus niger. J. Biotechnol*; **121:**284–289.

-Beuchat, R. (1992). Enumeration of fungi in grain flours and meals in flounced by setting in diluents and by the recovery medium. *J.food protc***.55**:899-901.

-Bhatti, H.N. and Saleem, N. (2009). Characterization of glucose oxidase from *Penicillium notatum .Food Technol. Biotechnol*; **47** :(3) 331-335.

-Biotene (2006) Biotene: dry mouth therapy by laclede. Available: http://www.laclede.com/products/toothpaste.asp. Accessed 2006 Dec.

-Biziulivichius, G, A. and Lukauskas, K. (1998). Invivo studies on Lysosulotilinz-Efficacy for Treatment of post –partum endometritis in cows-vet. *Food Technol. Biotechnol*; **29**(1): 47-58.

-Brookes, G., Neville, C. and Kniel, B. (2005) An analysis of labelling Requirements, market dynamics and cost implications. The Global GM Market—implications for the European food chain. UK: PG Economics Limited.

-Ciucu, A. and Pătroescua, C. (1984). Fast spectrometric method of determining the activity of glucose oxidase. *Analytical Lett***. 17** (12):1417-1427.

-Codex Alimentarius Commission (2007a) Glucono delta-lactone (575). Food additive details. Updated up to the 30th Session of The Codex Alimentarius Commission (2007) ed: Codex General Standard for Food Additives (GSFA) Onlin Database.

-Corriher, S. (2001). Yeast’s crucial roles in breadbaking. Fine Cooking **43**:80–81.

- Crueger, A, and Crueger, W. (1990). Glucose transforming Enzymes In: Microbial Enzymes and Biotechnology.*Elsevier Applied Science,* London, New York. 177- 226.

-Cui, G., Yoo, J.H., Woo, B.W., Kim, S.S., Cha, G.S. and Nam, H. (2001). Disposable amperometric glucose sensor electrode with

enzyme-immobilized nitrocellulose strip.*Talanta*.**54**:1105-1111.

- David, B., Archer, Ian, Connerton, F.and Donald, A. M.(2008). Filamentous Fungi for Production of Food Additives and Processing Aids. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* **.111**: 99–147.

-Dobbenie, D., Uyttendaele, M. and Debevere, J. (1995). Antibacterial activity of the glucose oxidase/glucose system in liquid whole egg. *J Food Protect*. **58:**273-279.

-Dondero, M., Egana, W., Tarky, W., Cifuentes, A. and Torres, J.A. (1993). Glucose oxidase/Cqtalase improves preservation of shrimp (Heterocarpus reedi). *J Food Sci* .**58**:774–779.

-El-Enshasy, A.H.(1998). Optimization of Glucose Oxidase production and excretion by recombinant *Aspergillus niger*.Ph.D.Thesis. Biochemical engineering Dept., Gesellschaft fur biotechnologische forschung mbH (GBF) Braunschweig, Germany, 29-30.

- EL-Sherbeny, G.A., Shindia, A. A., and Sheriff, Y.M.M.M.(2005). Optimization of Various Factors Affecting Glucose Oxidase activity Produced by *Aspergillus niger*. *International Journal of Agriculture& Biology;* **6:** 953–958.

-Enzyme Technical Association. (2001). Enzymes a Primer on use and Benefits today and tomorrow.

-Eremin, A.N., Makarenko, M.V. and Zhukovskaia, L.A. (2006). Isolation and characterization of extracellular glucose oxidase from *Penicillium adametzii* LF F-2044.1. *Prikl Biokhim Mikrobiol;* **42**:345–352.

-Fiedurek, J. and Gromada, A. (2000). Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. *J. Appl. Microbiol*. **89**(1):85-89.

- Fiedurek, J. and Gromada, A. (1997) . Screening of mutagenesis of moulds for improvement of the simultaneous production of catalase and glucose oxidase. *Enzyme Microb. Technol*; **20**:344-347.

-Field, C.E., Pivarnik, L.F., Barnett, S.M. and Rand, A.G. (1986).Utilization of glucose oxidase for extending the shelf-life of fish. *J Food Sci* ; **51**:66–70.

-Figoni, P.I. (2003). Bleaching and maturing agents. How baking works: exploring the fundamentals of baking science, Wiley, 1st edn, pp 71 ISBN 0-471-26856.

-Food standards Australia New Zealand. (2002) .Final assessment Report. Application A404–Lactoperoxidase system.

-Gary, J.P. (2000). Low- and reduced-alcohol wine: a review. *J Wine Res*; **11**:129–144.

- Gera, N., Uppaluri, R. V. S., Sen, S. and Venkata Dasuc, V.(2008). Growth Kinetics and Production of Glucose Oxidase Using *Aspergillus niger* NRRL326. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **22** (3) 315–320.

-Gerristen, M., Kros, A., Lutterman, J.A., Nolte, R.J.M. and Jansen.J .A. (2001).A percutaneous device as model to study the in vivo performance of implantable amperometric glucose sensors. *J. Mater. Sci*. **12**(2) 129-134.

- Gouka, R J., Punt P J. and van den Hondel C. A. M. J. J. (1997). Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **47**:1-11.

- Hamid, H, M., Rehman, Kh., Anjum, M, and Asgher, M. (2003). Optimization of Various Parameters for the Production of Glucose Oxidase from Rice Polishing Using *Aspergillus niger*.*Biotechnology*, **2**: 1–7.

- Hanft, F. and Kehler, P.(2006). Studies on the effect of glucose oxidase in bread making. *J. Sci. Food Agric*. **86**: 1699-1704.

-Hatziuikolaou, D. and Macris, B. (1995). Factors regulating Production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*; **17**: 530–534.

-Isaksen, A. and Adler-Nissen, J. (1997). Antioxidative effect of glucose oxidase and catalase in mayonnaises of different oxidative

susceptibility. I. Product trials. *Lebensm-Wiss Technol*. **30**:841–846.

-Jafari, A, R., Sarrafzadeh, I.and Vosoughi, M. (2007). Effect of Stirrer Speed and Aeration Rate on the production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. *J.Biot.Sci*; **7**(2): 270-275.

-Jernejc, K and Cimerman, A. (2001). Morphological characteristics, Extracellular and Intracellular protein and enzyme patterns of Five *Aspergillus species. Food Technol Biotechnol.* **39**(4):333-340.

- Kapata, A., Park, J.K.H., Hong, S.Y. and Cho, H.K. (1998). Effect of agitation and aeration on the extracellular glucose oxidase from a recombinant *Saccaromycess cervisiae. Bioprocess Eng***. 18**: 347-351.

-Kantt, C.A., Bouzas, J., Dondero, M. and Torres, J.A. (1993) Glucose oxidase/catalase solution for on-board control of shrimp microbial spoilage: model studies. *J Food Sci*. **58**:104–107.

- Khurshid, Sh., Kashmiri, M, A., Quershi, Z. and Ahmad, W. (2011). Optimization of glucose oxidase production by*Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology*; **10**(9):1674-1678.

-Kim, K. K., Fravel, D. R. and Papavizas, G. C. (1990). Production, purification, and properties of glucose oxidase from biocontrol fungus *Talaromyces flavus. Can. J. Microbiol*; **36**: 199-205.

-Kirk, O., Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C. (2002) Industrial enzyme Applications. *Curr Opin Biotech* .**13**:345–351.

-Klein, J., Rosenberg, M., Markoš, J., Dolgoš, O., Krošl?k, M. and Krištofikov?, L. (2002). Biotransformation of glucose to gluconic acid by *Aspergillus niger* – study of mass transfer in an airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal.* **3568**:1-9.

- Kona, R.P., Qureshi, N. and Pai, J.S. (2001). Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource Technol*., **78**: 123–126.

-Kusai, K., Sekuzu, I., Hagihara, B., Okunuki, K., Yamauchi, S. and Nakai, M. (1960). Crystallization of glucose oxidase from

Penicillium amagasakiense. *Biochim. Biophys. Acta*. **40**:555-557.

-Labuza, T.P. and Breene, W.M. (1989) Applications of "Active packaging" for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods 1. *J Food Process Pres* **13**:1–69.

-Leskovac, V., Trivic, S., Wholfahrt, G., Kandrac, J. and Pericina, D. (2005). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: The mechanism of action whith molecular oxygen, quinons and one electron acceptors. Int. *J. Bichem. Cell Biol*. **371**: 731-750.

-Liu, J., Haung, Z., Liu, Y, Y.and Weng, L,P. (2001). Effect of metal ions on simultaneous production of GOX and catalase by *A. niger*. *Lett.Appl.Microbiol;* **32**(16).

- Lium, S., Oelejeklaus, S., Gerhardh ,B. and Tudzynki, B. (1998). Purification and characterization of glucose oxidase of *Botyits cinerea. J. Physiol. Mol. Plant Pathol*; **53**: 123–132.

-Low, N., Jiang, Z., Ooraikul, B., Dokhani, S. and Palcic, M.M. (1989) Reduction of glucose content in potatoes with glucose oxidase. *J Food Sci*.**54**:118–121.

-Maheshwari,R.,Bharadwaj,G. and Bhat,M.(2000). Thermophilic Fungi: Physiology and Enzymes. Microbiology and Molecular Biology Reviews; **64**(3):461-488.

-Malherbe, D.F., Toit, M.d., Otero, R.R.C., Rensburg, P.v. and Pretorius, I.S. (2003) Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene *in Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Appl Microbiol Biot*. **61**:502–511.

- Malhotra, B.D., Singhal, R., Choubey, A., Sharma, S.K. and Kumar, A. (2005).Recent trends in biosensors. *Curr. Appl. Phys*; **5:**92-97.

-Manivannan, S. and Kathiresan, K. (2007). Effect of Medium Composition on Glucose Oxidase Production by *Penicillium fellutanum* isolated from Mangrove Rizosphere soil .*Research Journal of Microbiology* ; **2(**3):294-298.

-Marks, N.E., Grandison, A.S.and Lewis, M.J. (2001) Challenge testing of the lactoperoxidase system in pasteurized milk. *J Appl Microbiol*; **91**:735–74.

-Markwell, J., Frakes, G, L., Eugena, C, B., Osterman, J.and Wanger, F, W. (1989). *Aspergillus niger* mutants with increased glucose oxidase production *Appl. Microbial. Biotechnol.* **30**: 166**-** 169.

-Massa, S., Petruccioli, M., Brocchi, G.F., Altieri, C., Sinigaglia, M. and Spano, G. (2001) Growth inhibition by glucose oxidase system of enterotoxic *Escherichia coli* and *Salmonella derby*: in vitro studies. *World J Microb Biot*.**17**:287–291.

-Miron, J., Gonzalez, M., Pastrana, L. and Murado, M. (2002) . Diauxic production of glucose oxidase by *Aspergillus niger* in submerged culture — a dynamic model, *Enzyme Microb Technol;* **31**: 615–620.

-Moore, M.M. and Chen, T. (2006) .Mutagenicity of bromate: implications for cancer risk assessment. *Toxicology* .**221:**190–196.

- Nakarmura, T. and Ogura, Y. (1968) . Oxidation and reduction of copper proteins: note added to the previous report on the state and activity of copper atoms in copper proteins. *J Biochem*; **64**(2):267–270.

-National Library of Medicine. (2007a) Brand name: pet gold tartar Control toothpaste for dogs & cats. Household Products Database.

-National Library of Medicine (2007b) Brand name: Burts bees, baby Bee buttermilk lotion for sensitive skin. Household Products Database.

-Novo Nordisk ; A/S. (2004)> Enzymes at wark. Bagsvaerd, Denmark.

- Pardeep, K.and Satyanarayana, T (2006). Optimization of culture variables for improving glucoamylase production by alginate-entrapped Thermomucor indicae-seudaticae using statistical methods, *Bioresour Technol* **98**, 1252–1259.

-Petruccioli, M., Federici, F., Bucke, C. and Keshavarz, T. (1999). Enhancement of glucose oxidase production by *Penicillium variabile* P16. Enzyme *Microbial Technol*; **24:**397-401.

-Petruccioli, M., Piccioni, P. and Federici, F. (1997). Glucose oxidase Overproduction by the mutant strain M-80.10 of *Penicillium variabile* in a benchtop fermenter. *Enzyme & Microb. Technol*. **21**: 458-462.

- Petruccioli, M., Federici, F., Piccioni, P.and Fenice, M. (1995). Effect of Stirrer Speed and Buffering Agents on The production of glucose oxidase and Catalase by Penicillium variabile P16 in bench –top bioreactor .*Enzyme Microbial.Technol* **; 24**:336-339.

-Petruccioli, M. and Federici, F.(1993). Glucose oxidase production by *Penicillium variabile* P16: Effect of medium composition. *J. Appl. Bacteriol*; **75**: 369-372.

-Pickering, G.J., Heatherbell, D.A. and Barnes, M.F. (1999) .The production of reduced-alcohol wine using glucose oxidase treated juice. Part I.Composition. *Am J Enol Vitic*; **50**:291–298.

-Pickering , G.J., Heatherbell ,D.A. and Barnes, M.F. (1998) Optimising glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase. *Food Res Int*. **31**:685–692.

-Pulci, V., D'Ovidio, R., Petruccioli, M. and Federici, F. (2004). The glucose oxidase of *Penicillium variabile* P16: gene cloning, sequencing and expression. *Lett Appl Microbiol.*, **38**:233–238.

-Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A. and Larroche, C. (2006) .Gluconic acid: properties, applications and microbial production.*Food Technol Biotech*; **44**:185–195.

- Rando,D., Kohring, G.W.and Giffhorn, F.(1997). Production, Purification and characterization of glucose oxidase from newly isolated strain of *Penicillium pinophilum. Appl. Microbial Biotechnol.* **48**:34-40.

-Ragini, G., Bodade, C., Khobragade, N.and Saiful, A.(2010). Optimization of culture conditions for glucose oxidase production by a *Penicillium chrysogenum* SRT 19 strain. *Engineering in Life Sciences*; **10** (1): 35–39.

-Rogalski, J., Fiedurek, J., Szczordrak, J., Kapusta, K. and Leonowicz , A. (1988) .Optimization of glucose oxidase synthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* G-13 mutant. *Enzyme Microb. Technol.* **10**:508-511.

-Sabir, S., Bhatti, H.N., Zia, M.A. and Sheikh, M.A. (2007). Enhanced production of glucose oxidase using *Penicillium notatum a*nd rice polish. *food Technol.Biotechnol* ; **45**(4):443-446.

- Samson, R., Hoekstra, E., Frisvad, J.and Fiiltenborg, O. (2000). Introduction to Food born fungi 5th ed. Bearn Netherlands: Centraabreau voor Schimmel cultures.

-Sandholm, M., Ali-Vehmas, T., Kaartinen, L. and Junnila, M. (1988) Glucose oxidase (GOD) as a source of hydrogen peroxide for the lactoperoxidase (LPO) system in milk: antibacterial effect of the GOD–LPO system against mastitis pathogens. *J Vet Med.* **35**:346–352.

-Schallmey, M., Singh, A. and Ward, O. (2004). Developments in the use of *Bacillus species* for Industrial Production. can.*J.Microbial*; **50**: 1-17.

-Seifu, E., Buys, E.M., Donkin, E.F. (2005) .Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications. a review. *Trends Food Sci Tech***.** **16**:137–154.

- Sierra, J.F., Galban, J. and Castillo, J.R. (1997). Determination of glucose in blood based on the intrinsic fuorescence of glucose oxidase. *Anal. Chem*. **69**: 1471-1476.

-Simpson, C.(2007). Isolation, purification and characterization of a novel glucose oxidase from *Penicillium sp.* CBS 120262 optimally active at neutral pH. Protein Expression and Purification. **51**(2): 260-266.

-Simpson, C. (2006). Isolation, purification and characterization of a novel glucose oxidase from *Penicillium canescens* Tt42: Rhodes University.

-Sisak, C., Csanadi, Z., Ronay, E. and Szajani, B. (2006) .Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase. *Enzyme Microb Tech.* **39**:1002–1007.

- Stanbury, P., Whitaker, A .and Hall, S. (1997). Principles of Fermentation Technology (Second edition), Aditya books Private Limited, New Delhi, India , pp. 93–105.

-Sukhacheva, M.V., Davydova, M.E. and Netrusov, A.I. (2004). Production of *Penicillium funiculosum* 433 Glucose Oxidase and Its Properties. *Appl. Biochem.Microbiol***. 40** (1):25-29.

- Sunga, W.J. and Baeb, Y.H.(2006) . Glucose oxidase, lactate oxidase, and galactose oxidase enzyme electrode based on polypyrrole with polyanion/PEG/enzyme conjugate dopant. *Sensors and Actuators B*; **114**:164–169.

-Vemulapalli, V. and Hoseney, R.C. (1998). Glucose oxidase effects on gluten and water solubles. *Cereal Chem*; **75**:859–862.

-Volesky, B. and Laung, I. (1985). Microbial enzymes Production, Purification, and Isolation. *Critical reviews in Biotechnology***; 2**: 119-146.

-Wang, J.(2008). Electrochemical glucose biosensors-A review. *Chem. Rev.*, **108:**814-825.

-Watanab, T. (2002). Pictorial Atlas of soil and feed fungi, Morphology of ultured fungi and key to Species. 2nd. Ed. CRC press. London.

-Witt, S., Singh, M. and Kalisz, H.M. (1998). Structural and Kinetic Properties of Nonglycosylated Recombinant *Penicillium amagasakiense* Glucose Oxidase Expressed in *Escherichia coli. Appl. Enviro. Microbiol*. **64**(4):1405-1411.

- Witt, S., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H-J. and Kalisz, H.M. (2000). Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of b-D-glucose. *J. Biochem***. 347**:553-559.

- Witteveen, C.F.B., Veenhuis M. and Visser, J. (1992). Loccalization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Applied Environ Microbial*. **58**: 1190-1194.

- Witteveen, C.F.B., Vondervoort, P Van de., Swart, K. and Visser, J. (1990). Glucose oxidase overproducing and negative mutants of *Aspergillus nidulans. Appl. Environ. Microbial.* **33**:683-686.

- Wohlfahrt, G. S. , Witt, J. ,Hendle, D. ,Schomburg, H., Kalisz, M.and Hecht, H.J.(1999). A resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallogr, Sect.D***.** **55**:969-977.

-Yoo, W. and   Rand, A.G. (1995) Antibacterial effect of glucose oxidase on growth of *Pseudomonas fragi* as related to pH. *J Food Sci*; **60**:868–871.

-Yoon, J., Aishan, T., Maruyama, J. and Kitamoto, K. (2010). Enhanced production and secretion of heterologous proteins by the filmantous fungus *Aspergillus oryzae* via disruption of vacuolar protein sorting receptor gene Aovps 10.*Appl. Environ.Microbial*, **76**: 5718-5727.

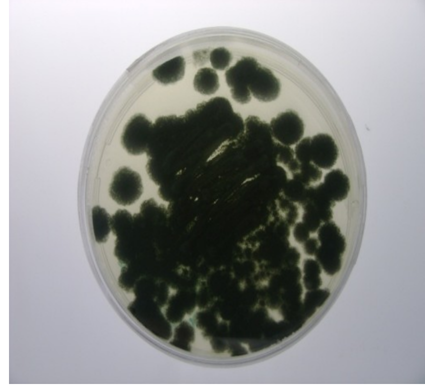
-Yu, R.J. and Scott, E.V. (1997) Method of using gluconic acid or gluconolactone for treating wrinkles. *US Patent*. **5**:677, 340.

-Yu, Z. and Zhang, H., (2004). Ethanol fermentation of acid hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. (93), 199-204.

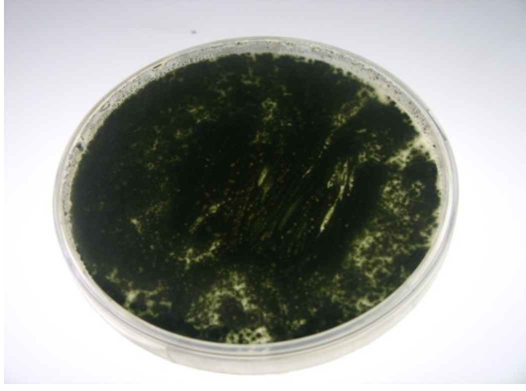
-Zetelaki, K. Z. (1970). The role of Aeration and Agitation in the Production of Glucose Oxidase in Submerged Culture. II. *Biotechnol. Bioeng*. **12**: 379-397.

-Zetelaki, K. and Vas, K. (1968). The role of Aeration and Agitation in the Production of Glucose Oxidase in Submerged Culture. *Biotechnol. Bioeng*; **10**:45-59.

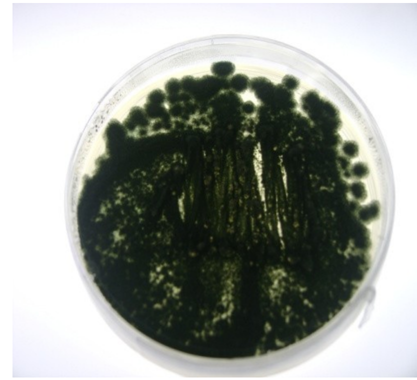
الملاحق
Appendixes



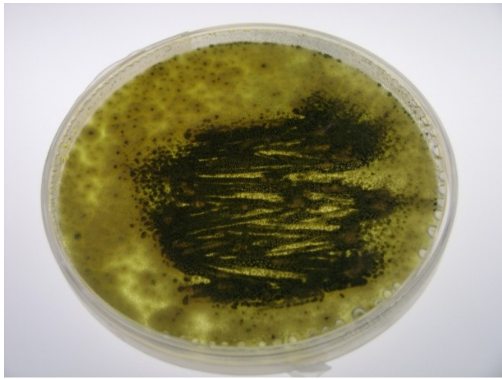
1



2



3



4

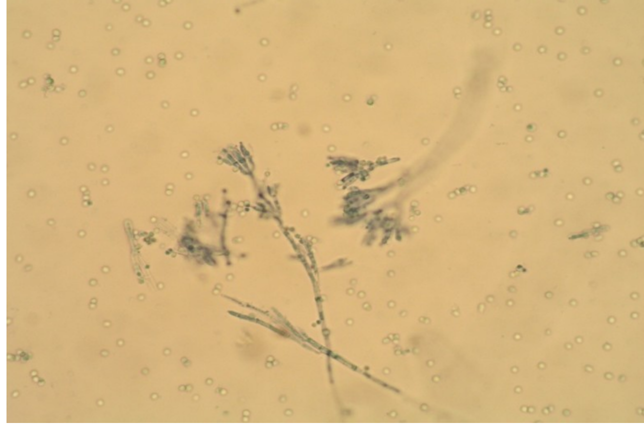


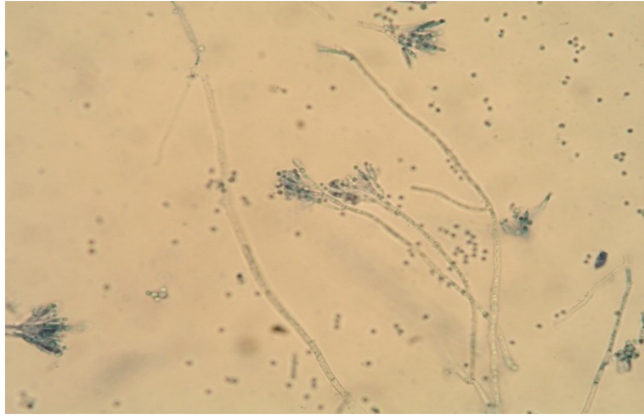
5

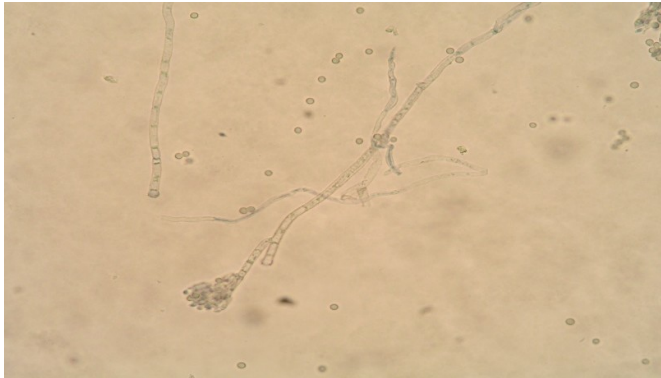


6

(1-2-3-4-5-6) صور للعزلات الفطرية المختلفة


7


8


9

(7-8-9) البنسليوم تحت المجهر



10



11



12

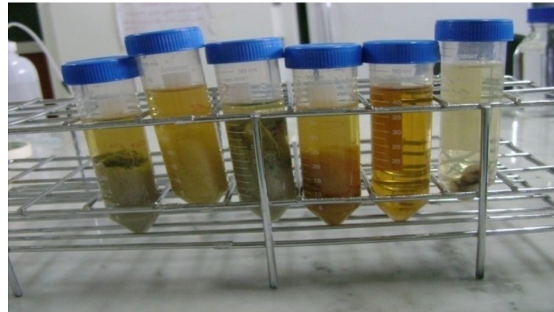
(10 – 11 – 12) أمثلة ظروف إنتاج الأنزيم



13



14



15



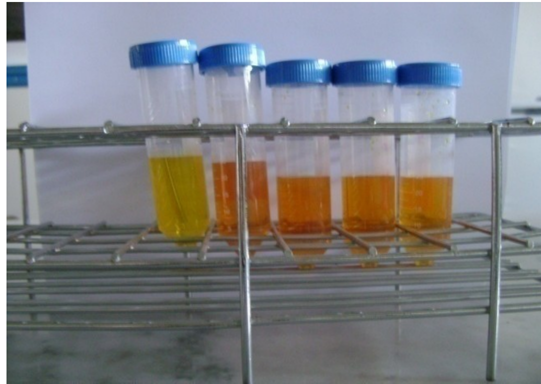
16

(13 -14 - 15) استخلاص الأنزيم بالخام بالتثفيل

(16) جهاز الطرد المركزي - المثقلة



17



18



19



20

(17 -18 – 19) قياس فعالية الأنزيم باختبار ال DNS
(20) جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer